



**FACULTAD DE CIENCIAS**

Departamento de Biología Molecular

**PROTEÍNAS VIRALES Y CELULARES IMPLICADAS EN  
LA REPLICACIÓN DE CORONAVIRUS**

AITOR NOGALES GONZÁLEZ

Madrid, Mayo de 2012

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

Departamento de Biología Molecular

**PROTEÍNAS VIRALES Y CELULARES IMPLICADAS EN  
LA REPLICACIÓN DE CORONAVIRUS**

Memoria presentada por Aitor Nogales González  
para optar al grado de Doctor en Ciencias  
por la Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, Mayo de 2012





El trabajo que se describe en esta memoria ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB, CSIC) bajo la codirección de los Drs. Fernando Almazán y Luis Enjuanes.

Madrid, Mayo de 2012

Fdo. Fernando Almazán

Fdo. Luis Enjuanes

## **AGRADECIMIENTOS**

*Escribir esta última parte de la tesis se torna difícil por la gran cantidad de personas a las que debo agradecer su apoyo y confianza durante todos estos años, pero a la vez resulta estimulante concluir una etapa científica y personal que tantos conocimientos y vivencias me ha proporcionado. Me enfrento a la defensa de mi tesis con la convicción de haber trabajado tenazmente para llevar a cabo espero un buen trabajo y con la nostalgia que provoca despedir un ciclo repleto de recuerdos.*

*En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores de tesis y copartícipes de este trabajo, el profesor Luis Enjuanes y el doctor Fernando Almazán, su confianza cuando me permitieron incorporarme al grupo de investigación para el desarrollo de mi tesis. De los cuales he adquirido experiencia y una gran formación científica, en un magnífico ambiente personal. Si alguien necesita un ejemplo de excelencia científica, probablemente se pueda hablar del laboratorio de Coronavirus del CNB.*

*Agradezco la financiación obtenida del entonces Ministerio de Educación y Ciencia mediante la concesión de una beca (BES-2005-7471) asociada al proyecto BIO2004-00636. Así como al resto de fuentes que han permitido llevar a cabo este trabajo (CSIC, Unión Europea e NIH) y al Centro Nacional de Biotecnología donde se ha realizado la tesis.*

*Este trabajo habría sido mucho más duro de no haberme encontrado un magnífico equipo a nivel profesional y humano dentro del laboratorio 114, con cuyos miembros pasados y presentes he compartido muy buenos momentos y siempre he encontrado la ayuda que he requerido. Por ello mi agradecimiento a todos. A mis dos extraordinarias e inteligentes compañeras de sección, la Dra. y artista Carmen Galán y la futura doctora Silvia Márquez, aunque sea del Barcelona. A los Drs. Jose Luis M., Kike y Juan que tanto animaban el laboratorio y a sus habitantes dentro y fuera del trabajo. Al Dr. Javier Ortego que nunca se fue del todo. Al Dr. Carlos Sánchez por proveernos de buena música y conversación. Al Dr. Francisco J. Iborra por sus productivas conversaciones, chistes y dejarme parasitar un trozo de su “MitoLab”. A las Dras. Isabel Sola y Sonia Zuñiga por poner a disposición de todos su valiosa experiencia con la mejor de sus sonrisas y ser un ejemplo de profesionalidad, además del soporte informático de Sonia. A Marga González por su magnífica disposición para ayudarnos en esa parte menos científica tan importante. A Diana Dorado y Beatriz con las que fue fantástico coincidir algunos años. Lucia y Raúl con los que he coincidido poco tiempo, pero a los que deseo lo mejor y estoy convencido que les irá muy bien en el laboratorio. A las Dras. M<sup>a</sup> Carmen Capiscol por sus ánimos y entereza durante y después del 114. Jazmina González por tantos buenos momentos, que tuvo que venir a Madrid para descubrir los “pies al gato”. A la Dra. Marta López, un ejemplo de compañerismo y la clase de persona que todo el mundo quiere encontrarse dentro y fuera del trabajo, con la que he compartido magníficos momentos. A los próximos doctores: Pedro, que siempre fue “big” y al que deseo mucha suerte en todo, next stop NY. José Luis N. compí de monoclonales, por su amistad y los buenos ratos que hemos pasado, Eeeee. A José Manuel y José Angel un dúo irrepetible, lleno de alegría, ParDieZ. Lorena, por vigilar que no explotasen mis tubos. Martina, sorry por el GP5-irrelevante de la tesis. Sarhay o “Sarayaka” por esa alegría tan contagiosa que irradia constantemente.*

*A todos los compañeros del departamento y del centro pasados y presentes, por tantos buenos momentos dentro y fuera de este edificio.*

*Quiero agradecer a todas las chicas de “protein-tools”, especialmente a Leonor y Mónica, su colaboración en este trabajo para la generación de los anticuerpos monoclonales, por su magnífica profesionalidad, un fantástico trato personal y su predisposición a resolver dudas y problemas.*

*Al profesor Jaime Renau Piqueras y su grupo de investigación en el Hospital de La Fe en Valencia, que me acogieron durante unas semanas en su laboratorio.*

*También me gustaría agradecer la ayuda y consejos de los diferentes servicios del CNB de los que he sido usuario. Silvia y las chicas del confocal, Silvia y Sergio en proteómica, donde realmente uno descubre lo importante que es disponer de gente altamente competente que realiza su trabajo con gran diligencia y pone a disposición de todos su experiencia y conocimientos, además de hacerlo con una sonrisa. También a Cristina Patiño del CNB y Maite Rejas del CBM por su asesoramiento y ayuda en los experimentos de microscopía electrónica. Sin olvidarme de Socorro, que cada mañana nos recibe con una sonrisa.*

*Gracias al profesor de investigación Antonio Villalobo con quien compartí mi primera etapa de investigación en su laboratorio y quien además de contribuir a mi formación, me animó para continuar en el sendero de la investigación, estimulando mi curiosidad por conocer lo desconocido en cualquier área de la ciencia.*

*También agradezco el apoyo de todos mis amigos, que tanto ayudan a desconectar, bien sea tomando unas cervezas, practicando algún deporte o viajando. Compañeros del colegio, instituto, universidad, buceo, montaña, karate o del viaje de la vida. A todos ellos que sería imposible enumerar, muchas gracias.*

*También me gustaría agradecer el apoyo de toda mi familia y el interés que siempre mostraron en el desarrollo de mi tesis. Porque ellos siempre fueron mis más desinteresados acreedores, con el préstamo de confianza que me regalaron.*

*Me he reservado el derecho de dejar para el final a mis padres, las personas a las que más debo en esta tesis y a las cuales he creído que era justo dedicar este trabajo. Por su confianza en todo momento, su apoyo, sus sacrificios para que yo pudiese llegar aquí, las piedras que construyeron mi camino y en definitiva los pilares que sustentan mis logros. Sin olvidarme de mi magnífica hermanita, de la que nunca me faltó una palabra de aliento y una sonrisa, mi psicóloga favorita y una artista de sueños.*

*En palabras de Blaise Pascal, al concluir un trabajo “Lo último que uno sabe, es por donde empezar”. Espero no haberme dejado ningún agradecimiento pendiente, pero si es así, agradezco la comprensión de mi olvido.*

*A mis padres*

## ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
Acm	Anticuerpo monoclonal
Acp	Anticuerpo policlonal
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Colección Americana de Cultivos Tipo)
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i> (cromosoma artificial de bacteriano)
BatCoV	Coronavirus de murciélago
BCoV	<i>Bovine coronavirus</i> (Coronavirus bovino)
BGH	<i>Bovine Growth hormona</i> (hormona de crecimiento bovina)
BHK	Células de riñón de hamster
CCD	<i>Charge-coupled device</i> (dispositivo de carga acoplada)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
3CL	<i>Chemotrypsin like-proteinase</i> (proteínasa similar a la quimiotripsina o proteína principal, M <sup>pro</sup> , similar a la proteína 3C de picornavirus)
CoV	Coronavirus
CMV	Citomegalovirus
CRT	Complejo de replicación-transcripción
CS	<i>Consensus sequence</i> (secuencia consenso para la transcripción)
DAPI	Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEN	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> (medio Eagle modificado por Dulbecco)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico, ADN)
DNAsa	Desoxirribonucleasa
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
dsRNA	<i>Double-stranded RNA</i> (RNA de doble cadena)
DTT	1,4-Ditiotreitol
EAV	<i>Equine arteritis virus</i> (virus de la arteritis equina)
EDTA	Ácido etilén diaminotetraacético
ELISA	<i>Enzyme-linked immuno-sorbent assay</i> (Ensayo por inmunoabsorción asociado a enzimas)
EPRS	<i>Glutamyl-prolyl-tRNA synthetase</i> (Glutamil-prolil tRNA-sintetasa)
FIPV	<i>Feline Infectious Peritonitis Virus</i> (virus de la peritonitis infecciosa felina)
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa)
H5	Células de insecto <i>high five</i>
hACE-2	<i>human angiotensin-converting enzyme 2</i> (enzima convertidora de angiotensina 2 humana)
HCoV	Coronavirus humano
HDV	<i>Hepatitis delta virus</i> (virus de la hepatitis delta)
Hdi	Horas después de la infección
Hdt	Horas después de la transfección
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2-etanosulfónico
hnRNP	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i> (ribonucleoproteína heterogénea nuclear)
HSP	<i>Heat shock protein</i> (proteína inducida por choque térmico)
Huh-7	Células de hepatocarcinoma humano
IBV	<i>Avian infectious bronchitis virus</i> (virus de la bronquitis infecciosa aviar)
IMAC	<i>Immobilized metal ion affinity chromatography</i>
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i> (sitio de entrada interna del ribosoma)
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i> (desorción/ionización por láser asistida por matriz)
MDI	Multiplicidad de infección
MHV	<i>Mouse hepatitis virus</i> (virus de la hepatitis de ratón)
MOPS	Ácido 3 - (N-morfolino) propanosulfónico
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (ácido ribonucleico mensajero)
MS	<i>Mass spectrometry</i> (espectrometría de masas)
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry</i> (espectrometría de masas en rondas sucesivas)
nm	nanómetro

nsp	<i>Nonstructural protein</i> (proteína no estructural)
nt	Nucleótido
ORF	<i>Open reading frame</i> (fase abierta de lectura)
PABP	<i>Polyadenine binding protein</i> (proteína de unión a tramos de poliadenina)
PAGE	<i>Polyacrilamide gel electrophoresis</i> (electroforesis en gel de poliacrilamida)
pAPN	<i>porcine aminopeptidase N</i> (aminopeptidasa N porcina)
pAPN-BHK	<i>pAPN-baby hamster kidney cells</i> (línea celular de riñón de hámster que expresa la aminopeptidasa N porcina)
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	<i>Polymerase Chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PLP	<i>Papain like proteinase</i> (proteínasa similar a la papaína)
poliA	Tramo de poliadeninas, An
PRRSV	<i>Porcine reproductive and respiratory syndrome</i> (virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino)
PUF60	<i>Poly(U)-binding-splicing factor</i> (factor de <i>splicing</i> de unión a tramos de poliuridina)
PUR46-MAD	Virus TGEV, clon Purdue 46-MAD
PUR46-C11	Virus aislado del TGEV
PTB	<i>Polypyrimidine tract-binding protein</i> (Proteína de unión a tramos de polipirimidinas)
Q-RT-PCR	<i>Quantitative-reverse transcription-polymerase Chain reaction</i> (transcripción reversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)
RdRp	<i>RNA-dependent RNA-polymerase</i> (RNA polimerasa dependiente de RNA)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico, ARN)
RNAse	Ribonucleasa
rRNA	<i>Ribosomal ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico ribosomal)
RRS	<i>Arginyl-tRNA synthetase</i> (arginil-tRNA sintetasa)
RS	<i>Reverse sense</i> (sentido reverso)
RT	<i>Reverse transcription/transcriptase</i> (transcripción inversa; también transcriptasa reversa)
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcripción inversa
SARS	<i>Severe acute respiratory syndrome</i> (síndrome respiratorio agudo y grave)
SDS	Dodecilsulfato sódico
siRNA	<i>small interfering RNA</i> (RNA pequeño interferente)
sgmRNA	<i>subgenomic messenger RNA</i> (RNA mensajero subgenómico)
ssDNA	<i>single stranded DNA</i> (DNA de cadena sencilla)
ST	<i>Swine testis</i> (línea celular de testículo de cerdo)
STF	Suero de ternera fetal
TAE	Tampón Tris-acetato-EDTA
TAP	<i>Tandem affinity purification</i> (doble purificación por afinidad)
TBE	Tampón Tris-borato-EDTA
TE	Tampón Tris-EDTA
TGEV	<i>Transmissible gastroenteritis virus</i> (virus de la gastroenteritis porcina transmisible)
Tm	Temperatura de fusión
TRIM27	<i>Tripartite motif containing 27</i> (proteína 27 que contiene un dominio tripartito)
tRNA	<i>Transfer ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico de transferencia)
TRS	<i>Transcription-regulating sequence</i> (secuencia reguladora de la transcripción)
TVE	<i>Tobacco Etch Virus</i> (virus del mosaico del tabaco)
U	Unidades
UFP	Unidades formadora de placa
UTR	<i>Untranslated region</i> (región no traducida)
UV	Ultravioleta
VDM	Vesícula de doble membrana
VS	<i>Virus sense</i> (sentido viral)

## **I. ÍNDICE**

<b>I. ÍNDICE</b>	
<b>II. RESUMEN EN INGLÉS</b>	1
<b>III. INTRODUCCIÓN</b>	5
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS CORONAVIRUS	5
1.1 Clasificación taxonómica de los coronavirus	5
1.2 Enfermedades causadas por CoVs. Importancia sanitaria y socioeconómica	6
1.3 Estructura y composición del virión	8
1.4 Estructura del genoma y expresión génica	9
1.5 Ciclo viral	12
2. GENÉTICA REVERSA EN CoV	14
3. SÍNTESIS DE RNA EN CoV	15
3.1 Transcripción	15
3.2 Replicación	15
4. LA REPLICASA DE CORONAVIRUS	19
5. PROTEÍNAS CELULARES IMPLICADAS EN LA SÍNTESIS DE RNA DE CoV	22
<b>IV. OBJETIVOS</b>	25
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	27
1. CÉLULAS EUCARIÓTICAS	27
1.1 Líneas celulares	27
1.2 Cultivos de células eucarióticas	27
2. VIRUS	28
2.1 Aislados virales	28
2.2 Crecimiento y titulación del TGEV	28
2.3 Purificación de viriones del TGEV	28
2.4 Tratamiento con proteasa K de viriones purificados del TGEV	29
3. BACTERIAS	29
3.1. Cepas y cultivos de bacterias	29
3.2 Preparación de bacterias competentes	30
3.3 Transformación de bacterias competentes	30
4. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL DNA	31
4.1. Plásmidos	31



4.1.1 Plásmidos de bajo número de copias.....	31
4.1.2. Plásmidos de alto número de copias .....	31
4.2. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	32
4.3. Preparación y purificación de DNA plasmídico.....	32
4.4. Enzimas de restricción y modificación de DNA.....	32
4.5. Amplificación de DNA mediante PCR.....	32
4.6. Transfección de DNA.....	33
5. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES.....	33
5.1. Construcción del plásmido pBAC-SARS-CoV 5'-3' .....	33
5.2. Construcción de los plásmidos pFBHT-RdRp y pFBHT-RdRpDDAA.....	35
5.3. Construcción de los plásmidos pcDNA-F1, F2, F3 y F4.....	36
5.4. Construcción del plásmido pcTAP-RdRp.....	37
5.5. Construcción del plásmido pGBT9-RdRp.....	37
5.6. Construcción de los moldes para la transcripción <i>in vitro</i> de los extremos del genoma.....	38
6. GENERACIÓN DE BACULOVIRUS RECOMBINANTES.....	40
7. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL RNA.....	40
7.1. Extracción y purificación del RNA intracelular.....	40
7.2. Análisis del RNA mediante RT-PCR.....	40
7.3. Cuantificación del RNA mediante RT-PCR a tiempo real (Q-RT-PCR).....	41
8. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	42
8.1. Electroforesis de proteínas.....	42
8.2. Inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA).....	43
8.3. Transferencia electroforética de proteínas a membranas de nitrocelulosa e inmunodetección ( <i>Western blot</i> ).....	43
8.4. Inmunomicroscopía de fluorescencia.....	44
8.5. Microscopía electrónica.....	45
8.5.1. Tinción negativa de viriones purificados del TGEV.....	45
8.5.2. Procesamiento de muestras para estudios ultraestructurales.....	45
8.5.3. Procesamiento de muestras para inmunomicroscopía electrónica.....	46
8.6. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas.....	47

8.6.1. Preparación de muestras.....	47
8.6.2. Espectrometría de masas de desorción/ionización por laser asistida por matriz y acoplada a un detector de tiempo de vuelo (MALDI-TOF/TOF).....	47
8.6.3. Identificación de proteínas en las bases de datos.....	48
8.7. Expresión y purificación de proteínas recombinantes.....	48
8.7.1. Expresión de la RdRp del TGEV en baculovirus y purificación mediante cromatografía de afinidad metálica.....	48
8.7.2. Expresión y purificación de la RdRp fusionada al dominio TAP.....	49
9. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS.....	51
9.1. Generación de Acms frente a la RdRp del TGEV y mapeo epitópico.....	51
9.1.1. Obtención de Acms.....	51
9.1.2. Identificación de los epítomos reconocidos por los Acms.....	52
9.2. Generación de anticuerpos policlonales frente a las proteínas de la replicasa viral.....	52
10. OBTENCIÓN DE VDMs INDUCIDAS POR EL TGEV.....	54
11. MÉTODOLOGÍA UTILIZADA PARA EL AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON LOS EXTREMOS DEL GENOMA DEL TGEV .....	55
11.1. Transcripción <i>in vitro</i> y purificación de los extremos del genoma viral marcados con biotina.....	55
11.2. Preparación de extractos de proteínas citoplasmáticas.....	55
11.3. Cromatografía de afinidad de RNA.....	56
12. METODOLOGÍA UTILIZADA EN LOS ESTUDIOS DE SILENCIAMIENTO GÉNICO.....	57
12.1. Efecto del silenciamiento de genes celulares sobre la actividad del replicón del TGEV.....	57
12.2. Efecto del silenciamiento de genes celulares sobre la infección por TGEV.....	57
13. ENSAYO DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS.....	58

14. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD POLIMERASA EN VIRIONES PURIFICADOS DEL TGEV.....	59
15. DECLARACIÓN ÉTICA.....	59
<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
1. ESTUDIO DE PROTEÍNAS VIRALES IMPLICADAS EN LA REPLICACIÓN DE CoV.....	61
1.1. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS ENZIMAS DE PROCESAMIENTO DE RNA DE CoV.....	61
1.1.1. Construcción y caracterización funcional de un replicón del SARS-CoV.....	61
1.1.2. Estudio del requerimiento de las proteínas ExoN, NendoU y 2'-O-MT para la síntesis de RNA en CoV.....	65
1.2. CARACTERIZACIÓN DE LA RdRp DEL TGEV.....	70
1.2.1. Expresión en baculovirus y purificación de la RdRp del TGEV.....	70
1.2.2. Generación y caracterización de Acms frente a la RdRp del TGEV.....	72
1.2.3. Identificación de los epítomos reconocidos por los Acms de la RdRp.....	74
1.2.4. Identificación de la RdRp en células infectadas por el TGEV.....	74
1.2.5. Localización subcelular de la RdRp.....	76
1.2.6. Caracterización de las VDMs inducidas por el TGEV.....	78
1.2.7. Estudio de la presencia de la RdRp en las VDMs.....	80
1.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS NSPS 2, 3, 5 Y 8 DEL TGEV.....	82
1.3.1. Generación y caracterización de Acps frente a las nsps 2, 3, 5 y 8 del TGEV.....	82
1.3.2. Cinética de expresión de la RdRp y las nsps 2, 3 y 8.....	82
1.3.3. Estudio de la colocalización de las nsps 2, 3, 5 y 8 con la RdRp del TGEV.....	85
2. ESTUDIO DE PROTEÍNAS CELULARES IMPLICADAS EN REPLICACIÓN DE CORONAVIRUS.....	87
2.1. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE PROTEÍNAS CELULARES QUE INTERACCIONAN CON LOS EXTREMOS DEL GENOMA.....	87

2.1.1. Identificación de proteínas celulares que se unen diferencialmente a los extremos del genoma del TGEV.....	87
2.1.2. Análisis funcional de las proteínas que interaccionan preferencialmente con el extremo 3' del genoma.....	92
2.1.2.1. Efecto del silenciamiento génico de las proteínas que interaccionan con el extremo 3' del genoma sobre la síntesis de RNA de CoV.....	92
2.1.2.2. Efecto del silenciamiento de los genes GAPDH, PABP, hnRNP Q y EPRS en la infección por TGEV.....	95
2.2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CELULARES QUE INTERACCIONAN CON LA RdRp DEL TGEV.....	98
2.2.1. Identificación de proteínas celulares que interaccionan con la RdRp mediante la tecnología del TAP.....	98
2.1.2. Identificación de proteínas celulares que interaccionan con la RdRp mediante el sistema de doble híbrido en levaduras.....	100
3. ESTUDIO DE LA ENCAPSIDACIÓN DEL CRT.....	101
3.1. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE PARTÍCULAS VIRALES PURIFICADAS.....	101
3.2. ESTUDIO DE LA ENCAPSIDACIÓN DE LA RdRp.....	104
3.2.1. Identificación de la RdRp en partículas virales mediante <i>Western blot</i> .....	104
3.2.2. Identificación de la RdRp en partículas virales mediante inmunofluorescencia.....	106
3.2.3. Identificación de la RdRp en partículas virales mediante inmunomicroscopía electrónica.....	108
3.3. ESTUDIO DE LA ENCAPSIDACIÓN DE LAS NSPs 2, 3 y 8.....	109
3.3.1. Identificación de las nsps 2, 3 y 8 en partículas virales mediante <i>Western blot</i> .....	109
3.3.2. Identificación de las nsps 2, 3 y 8 en partículas virales mediante inmunomicroscopía electrónica.....	110
3.4. ESTUDIO DE LA ENCAPSIDACIÓN DE PROTEÍNAS CELULARES IMPLICADAS EN LA SÍNTESIS DE RNA DE CoV.....	111
3.4.1. Identificación de las proteínas celulares GAPDH, PABP, hnRNP Q y EPRS en partículas virales mediante <i>Western Blot</i> .....	111

3.4.2. Identificación de las proteínas celulares GAPDH, PABP, hnRNP Q y EPRS en partículas virales mediante inmunomicroscopía electrónica.....	112
3.5. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS COMPONENTES DEL CRT ENCAPSIDADOS.....	113
<b>VII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>115</b>
1. ESTUDIO DE PROTEÍNAS VIRALES IMPLICADAS EN LA REPLICACIÓN DE CORONAVIRUS.....	115
2. ESTUDIO DE PROTEÍNAS CELULARES IMPLICADAS EN REPLICACIÓN DE CORONAVIRUS.....	120
2.1 Identificación y estudio de proteínas celulares que interaccionan con los extremos del genoma del TGEV .....	121
2.2. Análisis de proteínas celulares que interaccionan con la RdRp del TGEV.....	124
3. ESTUDIO DE LA ENCAPSIDACIÓN DEL CRT EN LAS PARTÍCULAS VIRALES.....	125
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>129</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>131</b>
<b>X. ANEXO.....</b>	<b>153</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Taxonomía del orden <i>Nidovirales</i> .....	5
2. Estructura del virión de CoVs.....	9
3. Expresión génica de CoV.....	10
4. Mecanismo de salto de fase del ribosoma en CoV.....	11
5. Ciclo infectivo del CoV TGEV.....	13
6. Modelo de transcripción de CoV.....	16
7. Dominios de RNA en los extremos del genoma de CoV del género $\beta$ .....	18
8. Organización y procesamiento proteolítico de la replicasa del TGEV.....	19
9. Generación del plásmido pBAC-SARS-CoV 5'-3'.....	34
10. Eliminación del <i>frameshift</i> presente en la secuencia codificante de la RdRp del TGEV.....	36
11. Purificación de proteínas mediante la tecnología del TAP.....	50
12. Estrategia para la construcción de un replicón del SARS-CoV en un BAC.....	62
13. Caracterización funcional del replicón del SARS-CoV.....	64
14. Construcción y análisis funcional de una colección de replicones del SARS-CoV con deleciones en los dominios catalíticos de la ExoN, NendoU y 2'-O-MT.....	67
15. Construcción y análisis funcional de mutantes puntuales defectivos en la actividad ExoN, NendoU y 2'-O-MT.....	69
16. Análisis de la expresión de la RdRp y la RdRpDDAA en baculovirus.....	71
17. Purificación de la His-RdRp.....	72
18. Caracterización de los Acms específicos de la RdRp.....	73
19. Mapeo epitópico de los Acms de la RdRp.....	75
20. Identificación de la RdRp en células infectadas.....	76
21. Localización subcelular de la RdRp en células infectadas mediante	

inmunofluorescencia.....	77
22. Análisis de la colocalización de la RdRp y el dsRNA.....	78
23. Identificación de las VDMs en células infectadas mediante microscopía electrónica.....	79
24. Identificación de la RdRp en VDMs mediante <i>Western blot</i> .....	80
25. Identificación de la RdRp en las VDMs mediante inmunomicroscopía electrónica.....	81
26. Caracterización de los Acps frente a las nsps 2, 3, 5 y 8.....	83
27. Análisis de la cinética de expresión de la RdRp y las nsps 2, 3 y 8 mediante <i>Western blot</i> .....	84
28. Colocalización de las nsps 2, 3, 5 y 8 con la RdRp.....	85
29. Aislamiento e identificación de proteínas que interaccionan con los extremos del genoma.....	89
30. Análisis por <i>Western blot</i> de las proteínas que se unen preferencialmente a uno de los extremos del genoma.....	91
31. Efecto del silenciamiento de las proteínas que interaccionan con el extremo 3' del genoma sobre la actividad del replicón del TGEV.....	94
32. Análisis del efecto del silenciamiento de la expresión de las proteínas GAPDH, PABP, hnRNP Q y EPRS en la infección viral.....	96
33. Análisis proteómico de las proteínas celulares que copurifican con la RdRp.....	99
34. Identificación de proteínas virales y celulares en los viriones del TGEV....	102
35. Identificación de la RdRp en viriones purificados del TGEV.....	105
36. Análisis de la RdRp en viriones purificados del TGEV tratados con proteasa K.....	106
37. Análisis de la RdRp en viriones purificados del TGEV mediante inmunofluorescencia.....	107
38. Análisis de la RdRp en viriones purificados del TGEV mediante	

inmunomicroscopía electrónica.....	108
39. Análisis de la presencia de las nsps 2, 3 y 8 en viriones purificados del TGEV mediante <i>Western blot</i> .....	109
40. Análisis de la presencia de las nsps 2 y 3 en viriones purificados del TGEV mediante inmunomicroscopía electrónica.....	110
41. Análisis de la presencia de las proteínas celulares GAPDH, PABP, hnRNP Q y EPRS en viriones purificados del TGEV mediante <i>Western blot</i> .....	112
42. Análisis de la presencia de las proteínas celulares GAPDH, PABP, hnRNP Q y EPRS en viriones purificados del TGEV mediante inmunomicroscopía electrónica.....	113
43. Conservación de los epítomos de la RdRp del TGEV en otros CoVs.....	119



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>I.</b>	Géneros y especies de la subfamilia <i>Coronavirinae</i> .....	7
<b>II.</b>	Secuencias mínimas necesarias para la replicación de CoV.....	17
<b>III.</b>	Oligonucleótidos utilizados para la generación del plásmido pBAC-SARS-CoV 5'-3'.....	35
<b>IV.</b>	Oligonucleótidos utilizados para el clonaje de la RdRp del TGEV en diferentes vectores de expresión.....	38
<b>V.</b>	Oligonucleótidos utilizados para la generación de plásmidos que contienen los extremos 5' y 3' del genoma del TGEV.....	39
<b>VI.</b>	Oligonucleótidos utilizados para el análisis del RNA por RT-PCR.....	41
<b>VII.</b>	Oligonucleótidos utilizados para el análisis del RNA por Q-RT-PCR.....	42
<b>VIII.</b>	Anticuerpos utilizados en este trabajo.....	53
<b>IX.</b>	siRNAs utilizados en este trabajo.....	58
<b>X.</b>	Oligonucleótidos utilizados para la generación de replicones mutantes en las enzimas de procesamiento de RNA del SARS.....	66
<b>XI.</b>	Caracterización de los Acms específicos de la RdRp del TGEV.....	73
<b>XII.</b>	Proteínas aisladas por su unión diferencial a los extremos del genoma del TGEV.....	90
<b>XIII.</b>	Proteínas identificadas mediante la tecnología del TAP.....	100
<b>XIV.</b>	Proteínas celulares identificadas en viriones purificados del TGEV.....	103
<b>XV.</b>	Distribución de partículas de oro en viriones purificados del TGEV.....	111
<b>XVI.</b>	Conservación de las enzimas de metabolismo de RNA en CoV.....	117

## **II. RESUMEN EN INGLÉS**

Coronaviruses (CoVs) are enveloped plus-strand RNA viruses of the *Nidovirales* order, which cause a variety of enteric and respiratory diseases relevant in animal and human health, being of special interest the severe acute respiratory syndrome (SARS-CoV) in humans. CoV replication and transcription are complex processes that take place at cytoplasmic double membrane vesicles (DMVs) and involve coordinated processes of both continuous and discontinuous RNA synthesis. Both processes are mediated by a viral multienzymatic replicase complex encoded by the 20 Kb replicase gene, together with the participation of cellular factors, whose identity and role is largely unknown. The main objective of this thesis is the identification and the study of these viral and cell components of the CoV replication-transcription complex, using the SARS-CoV and the transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) as models.

To study the viral proteins involved in CoV RNA synthesis, a replicon of SARS-CoV was assembled into a bacterial artificial chromosome. The CoV replicase contains RNA dependent RNA polymerase (RdRp), RNA helicase, and protease activities (nsp3 and nsp5), which are common to positive-strand RNA viruses. In addition, the CoV replicase was predicted to contain the RNA-processing enzymes, 3'-5' exoribonuclease, endoribonuclease, and 2'-O-ribose methyltransferase, which are extremely rare or absent in other RNA viruses. Due the size of CoV genome (30 Kb) and the low fidelity of RdRp, these enzymatic activities might operate in a proof-reading mechanism to allow the stable maintenance of the CoV genome. Using the SARS-CoV replicon, we have shown that these RNA-processing enzymes were essential for efficient CoV replication and transcription.

In addition to CoV replicons, the availability of replicase proteins specific antibodies may provide an excellent tool to study the precise strategies of CoV replication and transcription. To this end, specific antibodies against the TGEV RdRp and the replicase proteins nsp2, nsp3, nsp5 and nsp8 (primase) were generated and characterized. In the case of the RdRp, a set of six monoclonal antibodies (mAbs) was generated. These mAbs recognized four physically close linear epitopes located in a 62-amino acid region of the RdRp N-terminal domain, suggesting that this region may constitute an immunodominant domain. Using these antibodies, the expression kinetic and the subcellular localization of the RdRp and the nsps 2, 3, 5 and 8, were analyzed by Western blot and confocal microscopy, respectively. All of these proteins shown similar expression kinetics and colocalized in perinuclear vesicles, which were further identified as DMVs where the viral RNA synthesis takes place.

Like many other RNA viruses, CoV may subvert several host factors to play a role in viral replication and transcription. The identification of these cellular factors was based on their interaction with either the TGEV genome ends, which contain essential cis-acting signals for viral RNA synthesis, or with the RdRp. Using the first approach, 10 cell proteins preferentially interacting with either the 5' or 3' ends of the TGEV genome were identified. Among these proteins, the polypyrimidine tract-binding protein (PTB) preferentially interacted with the 5' end of the genome, while a subset of 9 proteins, including several hnRNPs (A1, A0, A2B1, Q, and U), the glutamyl-prolyl-tRNA synthetase (EPRS), the arginyl-tRNA synthetase (RRS), the poly(A)-binding protein (PABP), and the p100 transcriptional co-activator, showed a preferential binding to the 3' end. Silencing studies using siRNAs were performed to analyze the relevance of these proteins on TGEV infection. A significant and highly reproducible reduction close to 3-fold in RNA synthesis and virus titers was found after silencing the expression of PABP, hnRNP Q and EPRS proteins, suggesting that these proteins play a positive role in TGEV infection. Interestingly, silencing of the control gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) caused a 3-fold increase in TGEV RNA synthesis and virus titers, suggesting that this protein might have a role counteracting TGEV infection. Using the second approach, five cell proteins interacting with the RdRp were identified using the yeast two-hybrid system or by tandem-affinity-purification. These proteins included the HSP70, the  $\beta$ -actin, the casein subunit 1 $\alpha$ , the splicing factor PUF60 and the transcription factor TRIM27. The relevance of these proteins in CoV RNA synthesis is being studied.

In contrast to negative-strand RNA viruses, it is currently accepted that in plus-strand RNA viruses the replication complex is not encapsidated. However, a proteomic analysis of highly purified TGEV suggested the incorporation of the RdRp and several cell proteins into the viral particles. To further investigate whether the RdRp is encapsidated, its presence into viral particles was analyzed by Western blot. A polypeptide of 105 kDa, corresponding to RdRp, was specifically detected in highly purified TGEV virions even after treatment with proteinase K. To provide additional evidence of the RdRp encapsidation, purified TGEV was analyzed by confocal microscopy and immuno-electron microscopy, demonstrating that RdRp was incorporated into the virions. Taken into consideration that RdRp is a key enzyme of the replication-transcription complex, the encapsidation of other viral components of this complex, such as the nsps 2, 3 and 8, was also analyzed. The nsps 2 and 8 were also

incorporated into the viral particles, and nsp3 was probably present in the viral envelope. Interestingly, several cell proteins involved in CoV RNA synthesis, such as the PABP, GAPDH, hnRNP Q and EPRS, were also detected within the viral particles, suggesting that the replication complex might be encapsidated in CoVs. It could be postulated that this complex could act as a starting replication machinery, leading to a limited genome amplification before translation, to improve the efficiency of virus infection.

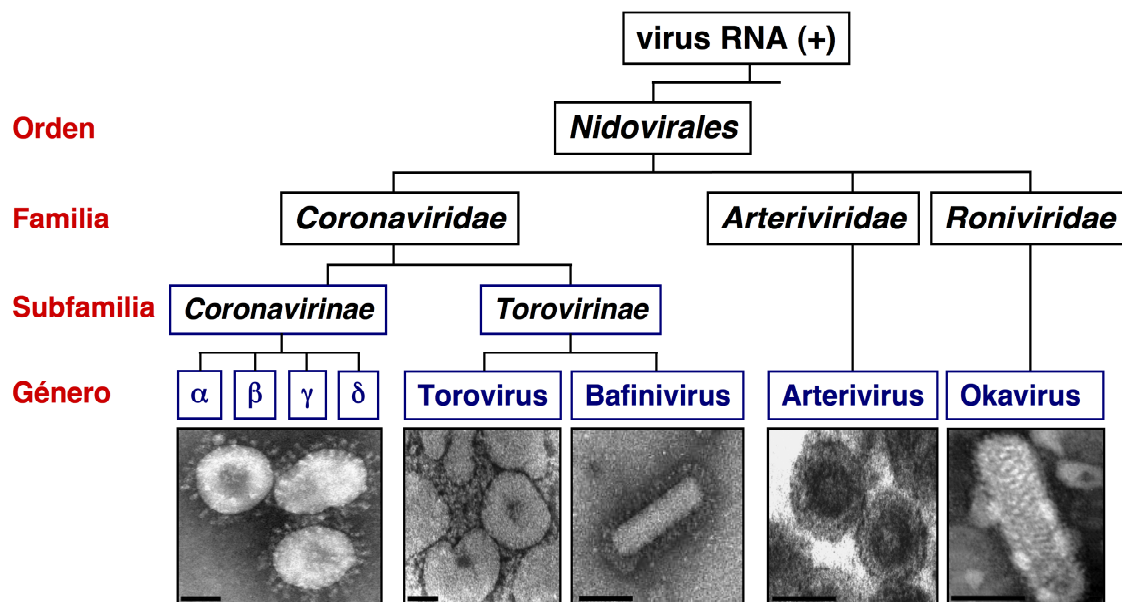


### **III. INTRODUCCIÓN**

## 1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS CORONAVIRUS

### 1.1. Clasificación taxonómica de los coronavirus

Los coronavirus (CoVs) son virus con envuelta que contienen un genoma RNA no segmentado, de cadena sencilla y polaridad positiva. Los CoVs pertenecen a la familia *Coronaviridae* que junto con las familias *Arteriviridae* y *Roniviridae* constituyen el orden *Nidovirales* (del latín *Nidus*, nido), cuya característica principal es la producción de mRNAs 3' coterminales (Carstens, 2010; de Groot y col., 2011; Enjuanes y col., 2008a) (Fig. 1). La familia *Arteriviridae* incluye el único género *Arterivirus*, cuyos representantes mas estudiados son el virus de la arteritis equina (EAV) y el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV), que causan problemas reproductivos y respiratorios en caballos y cerdos, respectivamente (Snijder y Spaan, 1995; Lunney y col., 2010). La familia *Roniviridae* incluye el género *Okavirus* que infecta a invertebrados, como gambas y langostas (Walker y col., 2005). La familia *Coronaviridae* se compone a su vez de las subfamilias *Coronavirinae* y *Torovirinae*, esta última compuesta por los géneros *Torovirus* y *Bafinivirus*.



**Figura 1. Taxonomía del orden *Nidovirales*.** Se muestran las familias, subfamilias y géneros del orden *Nidovirales*, junto con micrografías electrónicas representativas de cada género. Barra, 50 nm.



Atendiendo a criterios genéticos y antigénicos, la subfamilia *Coronavirinae* se ha dividido en los géneros *Alpha*, *Beta* y *Gammacoronavirus* ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , respectivamente), los cuales incluyen más de 20 especies (Tabla I) que infectan a un amplio rango de vertebrados, principalmente mamíferos y aves.

Recientemente, se han descrito varios CoVs de aves que han sido agrupados provisionalmente en un nuevo género, llamado *Deltacoronavirus* ( $\delta$ ) (de Groot y col., 2011). Además, se ha descrito un nuevo nidovirus que infecta insectos, denominado Cavally virus (CAVV), el cual sería el único representante de una nueva familia dentro del orden *Nidovirales* (Nga y col., 2011; Zirkel y col., 2011).

## 1.2. Enfermedades causadas por CoVs. Importancia sanitaria y socioeconómica

Los CoVs de los géneros  $\alpha$  y  $\beta$  infectan a mamíferos, incluido el hombre, y los del género  $\gamma$  a aves (Tabla I), provocando enfermedades de gran importancia en explotaciones ganaderas (CoVs porcinos, bovinos y aviares), en animales de compañía (CoVs felinos y caninos) y en animales de experimentación (CoVs murinos). Además, recientemente se han descrito al menos 60 CoVs pertenecientes a los géneros  $\alpha$  y  $\beta$  que infectan murciélagos (Decroly y col., 2008; Dominguez y col., 2007; Gloza-Rausch y col., 2008; Tong y col., 2009; Woo y col., 2007). En general, los CoVs infectan principalmente células epiteliales de los tractos respiratorio y entérico, provocando enfermedades respiratorias y gastrointestinales, aunque también ocasionan afecciones hepáticas, cardíacas, oculares o del sistema nervioso (Perlman y col., 2000), entre otras patologías (Tabla I).

Los CoVs humanos (HCoVs) fueron identificados por primera vez a finales de los años 60 (McIntosh y col., 1969) como los principales responsables del 10-20% de los resfriados comunes. Entre estos, los mas estudiados son el HCoV-229E y el HCoV-OC43 (Myint, 1995). En el año 2003 los CoVs atrajeron la atención mundial debido a la emergencia en China del CoV causante del síndrome respiratorio agudo y severo (SARS-CoV), que infectó a más de 8000 personas de 32 países causando una mortalidad del 10% (Drosten y col., 2003; Rota y col., 2003). Desde entonces, se han identificado nuevos CoVs en humanos, como el HCoV-NL63 (van der Hoek y col., 2004) y el HCoV-HKU1 (Woo y col., 2005), que producen neumonías relativamente graves.

Entre los CoVs que infectan animales, el de mayor relevancia es el virus de la gastroenteritis porcina transmisible (TGEV), que junto con el SARS-CoV constituyen

los modelos de estudio de esta tesis. El TGEV pertenece al género  $\alpha$  y produce una enteritis muy contagiosa en lechones recién nacidos, con índices de mortalidad próximos al 100% (Saif y Wesley, 1992). La enfermedad, descrita por primera vez en 1935 en EEUU (Doyle y Hutchings, 1946), se ha identificado en numerosos países europeos, incluyendo España, en América Central y del Sur, en Canadá y en diversos países asiáticos. Actualmente, la mayor parte del ganado porcino europeo presenta inmunidad parcial frente al virus TGEV (Enjuanes y Van der Zeijst, 1995; Pensaert y Van Reeth, 1998) debido a la diseminación de un mutante natural atenuado, el CoV respiratorio porcino (PRCoV), el cual no produce síntomas clínicos. En EEUU, América del Sur, Rusia y China la diseminación del virus PRCoV no parece haber sido

**TABLA I. GÉNEROS Y ESPECIES DE LA SUBFAMILIA *CORONAVIRINAE***

Género	Especie	Designación <sup>(a)</sup>	Hospedador	Enfermedad
$\alpha$	Virus de la gastroenteritis porcina transmisible	TGEV	Cerdo	Enteritis
	CoV respiratorio porcino	PRCoV	Cerdo	Respiratoria
	Virus de la peritonitis infecciosa felina	FIPV	Gato	Peritonitis
	CoV canino	CCoV	Perro	Enteritis
	CoV humano 229E	HCoV-229E	Humano	Respiratoria
	Virus de la diarrea epidémica porcina	PEDV	Cerdo	Enteritis
	CoV humano NL63	HCoV-NL63	Humano	Neumonía
	CoV felino	FCoV	Gato	Peritonitis
	CoV de murciélago HKU2	BatCoV-HKU2	Murciélago	Asintomático
	CoV de murciélago 512	BatCoV-512	Murciélago	Asintomático
$\beta$	Virus de la hepatitis de ratón	MHV	Ratón	Hepatitis
	CoV humano OC43	HCoV-OC43	Humano	Enteritis
	CoV del SARS	SARS-CoV	Humano	Neumonía
	CoV bovino	BCoV	Vaca	Enteritis
	Virus de la encefalitis hemaglutinante porcina	HEV	Cerdo	Encefalitis
	CoV de la rata	RCoV	Rata	Respiratoria
	Virus de la sialodacrioadenitis	SDVA	Rata	Adenitis
	CoV equino	ECoV	Caballo	Enteritis
	CoV humano HKU1	HCoV-HKU1	Humano	Neumonía
	CoV de murciélago HKU3	BatCoV-HKU3	Murciélago	Asintomático
	CoV de murciélago HKU5	BatCoV-HKU5	Murciélago	Asintomático
	CoV de murciélago HKU8	BatCoV-HKU8	Murciélago	Asintomático
$\gamma$	Virus de la bronquitis infecciosa	IBV	Pollo	Respiratoria
	CoV del pavo	TCoV	Pavo	Nefritis
	CoV del faisán	PhCoV	Faisán	Respiratoria
	CoV del ganso	GCoV	Ganso	Bajo peso
	CoV del pato	DCoV	Pato	Bajo peso
	CoV de la ballena Beluga SW1	BWCoV-SW1	Beluga	Desconocido

(a) En esta memoria se utiliza la nomenclatura de la subfamilia *Coronavirinae* del noveno informe del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV).

tan efectiva como en Europa (Woods y Wesley, 1998) y la enfermedad continúa siendo un problema económico para los productores de ganado porcino.

Además de la importancia sanitaria y económica, los CoVs han adquirido una gran relevancia mundial por la posible transmisión de estos virus desde los murciélagos (portadores de antecesores comunes recientes de CoVs de los géneros  $\alpha$  y  $\beta$ ) a otras especies, incluyendo la humana.

### **1.3. Estructura y composición del virión**

Los CoVs son virus esféricos con un diámetro de aproximadamente 100-150 nm (Pike y Garwes, 1977). En la envuelta se encuentran integradas las proteínas estructurales S, M y E (Fig. 2). La proteína S es una glicoproteína de membrana de tipo I de 170 a 220 kDa, dependiendo de la especie de CoV y el grado de glicosilación. Es la proteína más prominente de la envuelta del virus y se asocia formando trímeros que constituyen las proyecciones características de los CoVs, denominadas espículas o peplómeros (Delmas y Laude, 1990; Garwes y Pocock, 1975; Sturman y V., 1977). Las espículas dan al virus su apariencia de corona. La proteína S interviene en la unión con el receptor celular y en la fusión de las membranas del virus y la célula hospedadora, confiere la especificidad de tejido y especie y es la principal inductora de anticuerpos neutralizantes (Delmas y col., 1986; Gallagher y Buchmeier, 2001; He y col., 2006; Jimenez y col., 1986; Traggiai y col., 2004; Zhang y col., 2006).

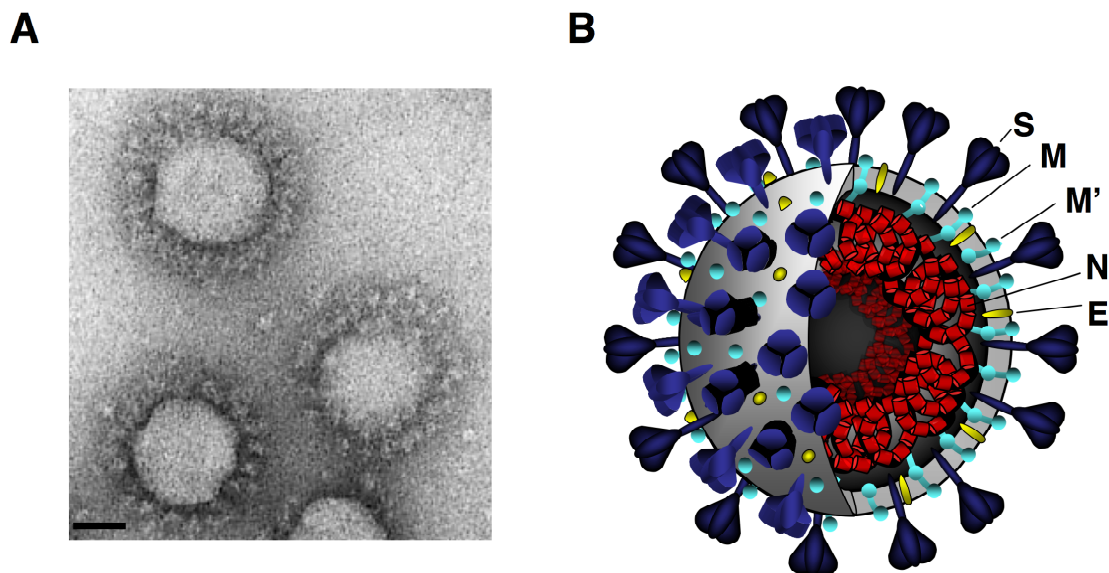
La proteína M, es una glicoproteína integral de la envuelta de unos 29 a 36 kDa y el componente estructural más abundante del virión (Sturman y col., 1980; Sturman y V., 1977). Está formada por un pequeño segmento N-terminal situado hacia el exterior de la partícula viral, tres dominios transmembrana y un extremo C-terminal orientado hacia el interior del virión que interacciona con la nucleoproteína N. En el caso del TGEV, la proteína presenta dos topologías, la segunda de ellas (M') con ambos extremos orientados hacia el exterior de la partícula viral (Fig. 2) (Escors y col., 2001).

La proteína E, es una proteína transmembrana minoritaria de unos 10 kDa y esta implicada en el ensamblaje y la morfogénesis viral (DeDiego y col., 2007; Kuo y Masters, 2003; Ortego y col., 2002). Recientemente se ha descrito que la proteína E forma canales iónicos (Verdia-Baguena y col., 2012; Wilson y col., 2006a, b; Wilson y col., 2004), aunque su papel en la infección aún no ha sido determinado.

Además de las proteínas S, M y E, algunos CoVs del género  $\beta$  como el MHV, presentan en la envuelta viral una proteína con homología a la hemaglutinina (Brian y

col., 1995; King y col., 1985). En el caso del SARS-CoV se ha descrito la presencia de las proteínas específicas de grupo 3a, 6, 7a y 7b (Huang y col., 2006; Huang y col., 2007; Ito y col., 2005; Schaecher y col., 2007; Shen y col., 2005), cuyo papel en el ciclo viral se conoce parcialmente.

En el interior del virión se encuentra la cápsida viral, formada por la asociación del extremo C-terminal de la proteína M de la envuelta (Fig. 2) (Escors y col., 2001) con la nucleoproteína (N) de la nucleocápsida helicoidal, compuesta por el genoma RNA asociado a la proteína N. Esta es una fosfoproteína de unos 40 kDa que desempeña un papel fundamental tanto a nivel estructural como en la síntesis del RNA viral (Almazan y col., 2004; Thiel y col., 2003a). Recientemente, se ha descrito que la proteína N del TGEV y del SARS-CoV tiene actividad chaperona de RNA (Zuñiga y col., 2007) y que esta actividad es necesaria en la transcripción del genoma viral.

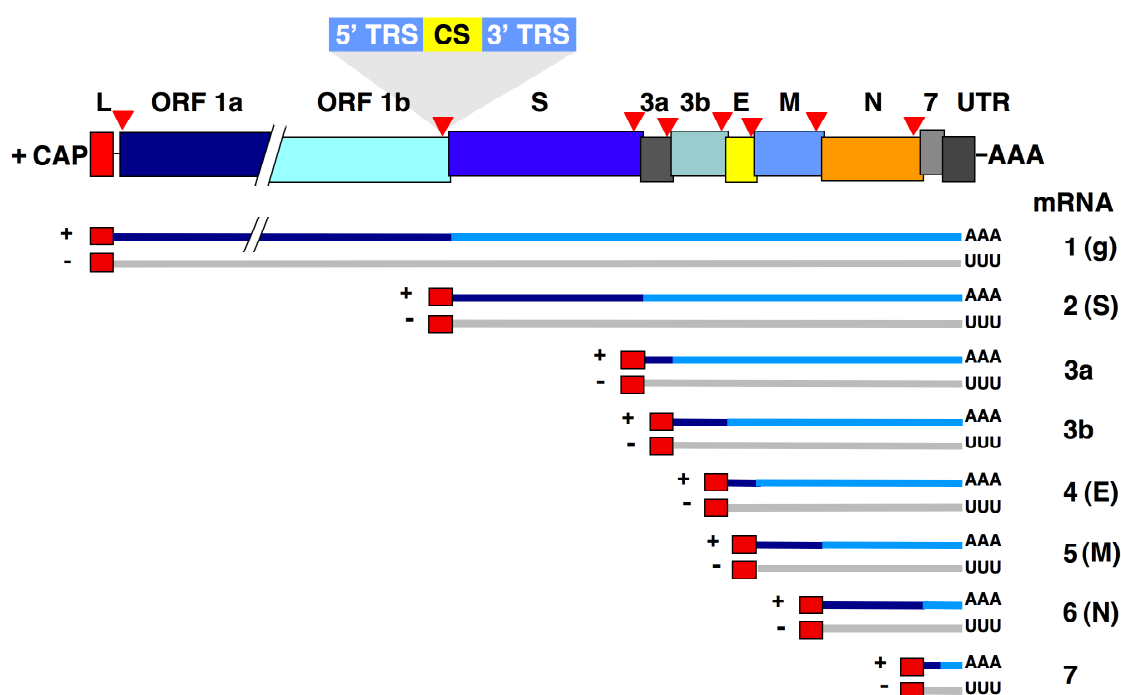


**Figura 2. Estructura del virión de CoVs.** (A) Micrografía electrónica de viriones purificados del TGEV. Se observan los peplómeros formados por la proteína S, que dan al virus un aspecto de corona. Barra, 50 nm (B) Modelo estructural de la partícula viral. Se muestran los niveles estructurales que la conforman. La envuelta lipídica, en la que se integran las proteínas S, E y M (en dos conformaciones M y M'), la cápsida interna constituida por la proteína N asociada al endodominio C-terminal de la proteína M y la nucleocápsida helicoidal formada por el genoma RNA asociado a la proteína N.

#### 1.4. Estructura del genoma y expresión génica

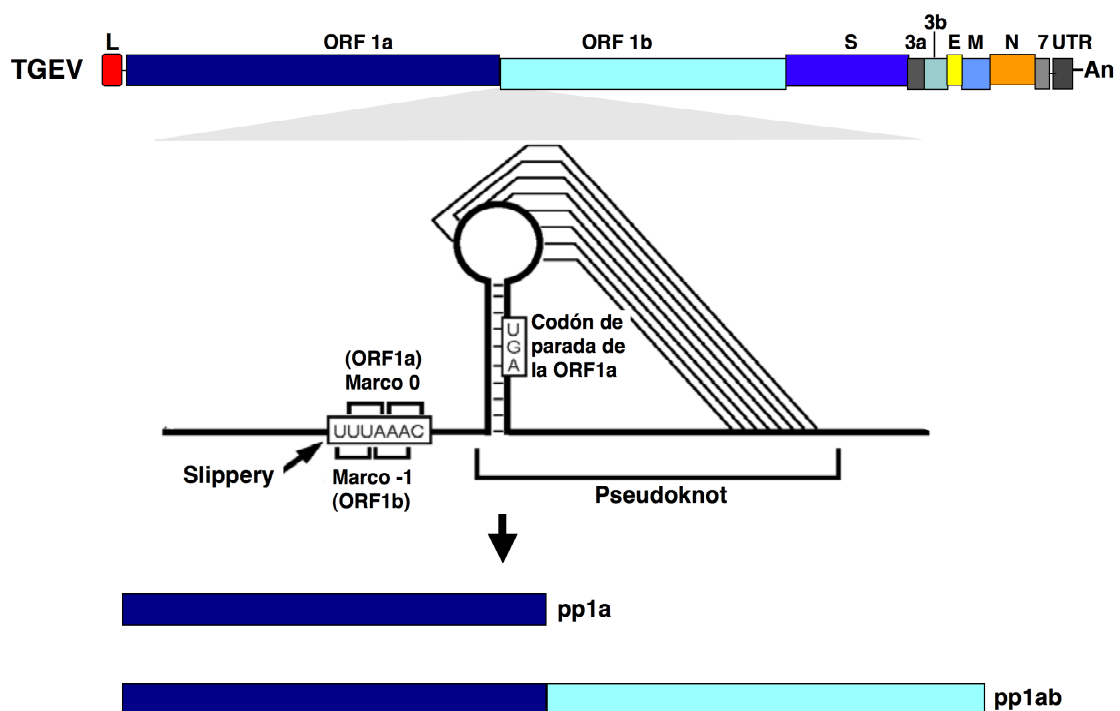
El genoma de los CoVs consiste en un RNA no segmentado, de cadena sencilla y polaridad positiva, con un tamaño que varía entre 28 y 30 kb, dependiendo del CoV (de Groot y col., 2011; Enjuanes y col., 2008a; Gorbalenya y col., 2004; Snijder y col., 2003) (Fig. 3). Estructuralmente se asemeja a los mRNAs eucarióticos, dado que

contienen una estructura cap en el extremo 5' (Page y col., 1990), está poliadenilado en el extremo 3' (Jacobs y col., 1986) y posee regiones no traducidas en ambos extremos (5'UTR y 3'UTR) con una longitud entre 210 y 530 nt. Sin embargo, se diferencia de los mRNAs eucarióticos por su enorme tamaño (el de mayor longitud conocido entre los virus RNA) y su estructura policistrónica. El genoma está formado por una secuencia líder en el extremo 5' de 99 nt en el caso del TGEV y de 72 nt en el SARS-CoV, seguida de la región 5'UTR, el gen de la replicasa que ocupa 20 kb, los genes estructurales y accesorios S-3a-3b-E-M-N-7 en TGEV y S-3a-3b-E-M-6-7a-7b-8a-8b-9b-N en SARS-CoV (Masters, 2006), la región 3'UTR y el poliA. Más de dos tercios del genoma están ocupados por el gen de la replicasa, constituido por dos fases de lectura solapantes (ORF1a y ORF1b) que se traducen directamente a partir del RNA genómico, al inicio de la infección, dando lugar a dos poliproteínas co-amino terminales, pp1a y pp1ab. La pp1ab se traduce mediante un salto de fase del ribosoma (*frameshift*), que ocasiona el retroceso de un nucleótido, dirigiendo una fracción de los ribosomas que están elongando hacia una fase de lectura alternativa y permitiendo



**Figura 3. Expresión génica de CoV.** En la parte superior se muestra el esquema del genoma del TGEV, en el que se indican la estructura cap (+CAP), la secuencia líder (L), los genes virales (ORF1a, ORF1b, S, 3a, 3b, E, M, N, 7), la región 3' no traducida (UTR), el poliA (AAA) y las TRS (triángulos rojos invertidos) constituidas por la CS (CUAAAC, en el caso de TGEV) y las secuencias flanqueantes 5' y 3' TRS. En la parte inferior se muestran los RNAs virales resultantes de la transcripción, numerados por tamaño del 1 al 7, indicándose su polaridad y estructuras terminales comunes. Las secuencias líder y antilíder se muestran en rojo y la secuencia codificante traducida a partir de cada mensajero policistrónico en azul oscuro.

evitar el codón de terminación del ORF1a para continuar la traducción dentro de la ORF1b (Fig. 4). Este proceso ocurre con una eficiencia del 10 al 40 % (Brierley y col., 1987; Brierley y col., 1989; Gorbalenya y col., 1989; Schiller y col., 1998) y está regulado por dos motivos RNA, una secuencia heptamérica de deslizamiento del ribosoma (*slippery sequence*) y una estructura de falso lazo (*pseudoknot*), localizados en la región de solapamiento de la ORF1a y ORF1b. Ambas poliproteínas se autoprocresan dando lugar a 16 proteínas no estructurales (nsps), que en último término formarán parte del complejo de replicación-transcripción (CRT) (Gorbalenya y col., 1989; Ziebuhr, 2005; Ziebuhr y col., 2000).



**Figura 4. Mecanismo de salto de fase del ribosoma en CoV.** En la parte superior de la figura se muestra el esquema del genoma del TGEV (los genes y elementos estructurales son los mismo que en la figura 3) y en la parte inferior el mecanismo de salto de fase del ribosoma que permite la síntesis de la poliproteína pp1ab. Cuando los ribosomas alcanzan la secuencia de deslizamiento del ribosoma (*Slippery*, UUUAAAC), sufren una parada por la presencia de la estructura de falso lazo (*Pseudoknot*), lo que permite que una determinada proporción de los ribosomas se deslicen un nucleótido hacia atrás produciéndose un cambio de marco de lectura de 0 a -1 y de esta forma circunvalar el codón de terminación de la ORF1a y continuar la traducción de la ORF1b.

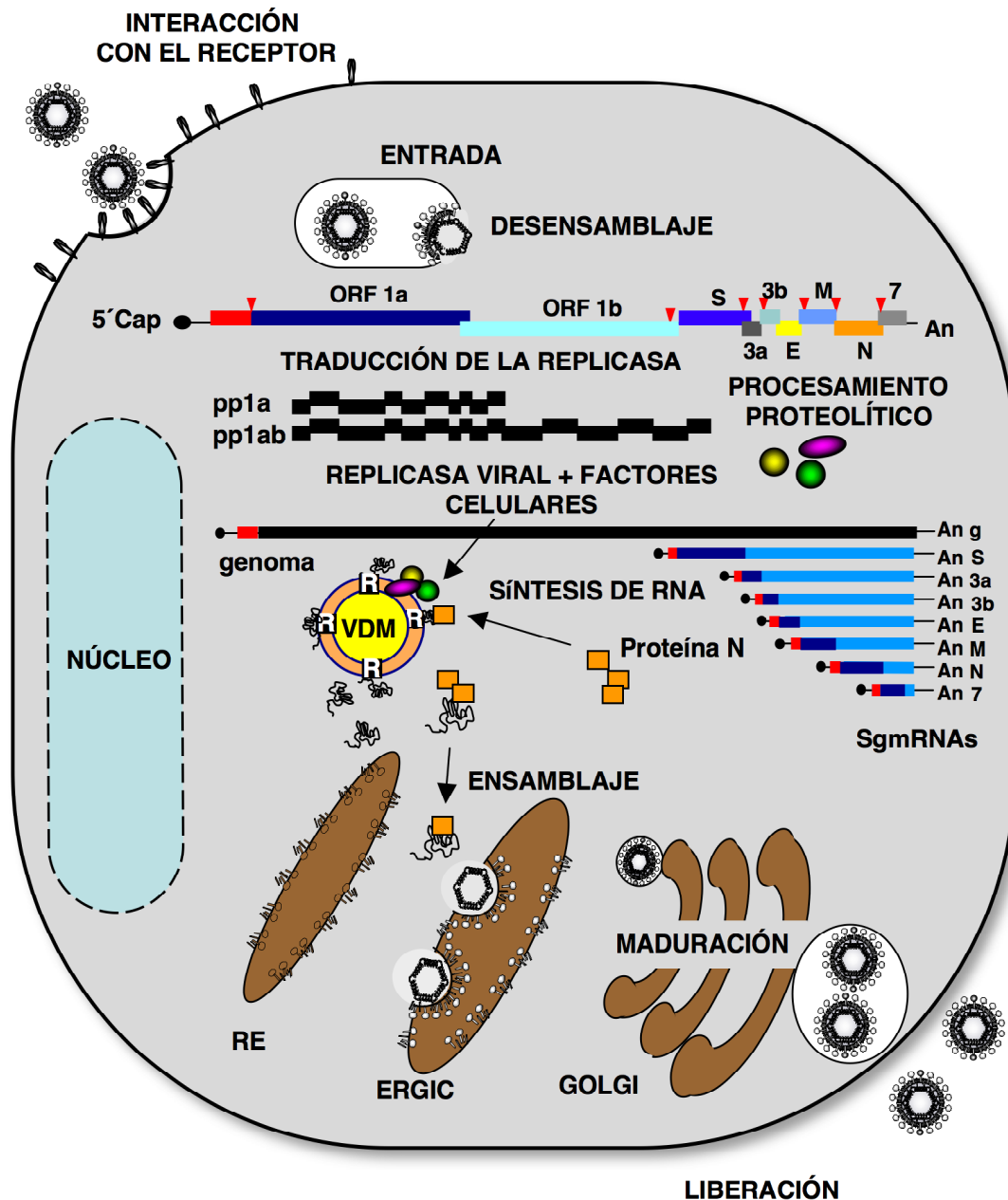
A diferencia del gen de la replicasa, los genes situados en el extremo 3' del genoma se expresan a partir de una colección de mRNAs subgenómicos (sgmRNAs) 5' y 3' coterminales. Todos los sgmRNAs presentan en su extremo 5' la secuencia líder del genoma viral, la cual se incorpora mediante un proceso de síntesis discontinua dirigido por las secuencias reguladoras de la transcripción (TRS). Estas secuencias se localizan

en el extremo 3' de la secuencia líder y precediendo a cada uno de los genes del extremo 3'. Las TRSs están formadas por un hexanucleótido central conservado (CS), cuya secuencia varía dependiendo de cada especie, flanqueado por secuencias de longitud variable denominadas 5' y 3' TRS que son importantes para la funcionalidad de la CS (Enjuanes y col., 2006b; Sola y col., 2005). Los sgmRNAs resultantes son estructuralmente policistronicos, pero por lo general sólo se traduce en cada caso la ORF situada en su extremo 5'-proximal.

### **1.5. Ciclo viral**

La infección por CoV comienza con la entrada del virus en la célula (Fig. 5), que está mediada por la interacción de la proteína S de la superficie del virus con el receptor celular. En el caso del TGEV, el receptor celular es la aminopeptidasa N porcina (pAPN) (Delmas y col., 1992), mientras que en SARS-CoV el receptor principal es la enzima convertidora de angiotensina 2 humana (hACE-2) (Li y col., 2003; Wong y col., 2004), pudiendo utilizar la glicoproteína CD209L como receptor alternativo (Jeffers y col., 2004). Después de la entrada del virus, se produce la liberación del genoma viral al citoplasma, donde es traducido dando lugar a las poliproteínas pp1a y pp1ab. Estas son autoproteasadas por tres proteasas virales dando lugar a 16 nsps que en último término, con la posible participación de proteínas celulares, constituyen el CRT (Enjuanes y col., 2006a; Galan y col., 2009; Masters, 2006). Este complejo se ensambla en vesículas de doble membrana (VDM), cuyo origen es el retículo endoplasmático (RE) (Brockway y col., 2003; Gosert y col., 2002; Knoops y col., 2008; Masters, 2006; Snijder y col., 2006). El genoma viral, sirve como molde para la síntesis de los genomas progenie y de los sgmRNAs a través de intermediarios de polaridad negativa de tamaño genómico o subgenómico, respectivamente (Sawicki y Sawicki, 1990; Sawicki y col., 2007). A partir de los sgmRNAs se traducen las proteínas estructurales y no estructurales del extremo 3' del genoma. Las proteínas estructurales S, M y E se integran en la membrana del RE y se translocan a las cisternas del compartimiento intermedio (ERGIC) (Ng y col., 2003; Nieto-Torres y col., 2011; Stertz y col., 2007; Tooze y col., 1984). Por otra parte la proteína N se une a los RNAs genómicos progenie formando las nucleocápsidas helicoidales, las cuales se asocian con los componentes estructurales integrados en el ERGIC a través de la interacción entre la proteína N y el extremo C-terminal de la proteína M (Narayanan y Makino, 2001; Sturman y col., 1980). Este proceso induce la invaginación de las membranas del ERGIC entorno a las

nucleocápsidas, dando lugar a los viriones inmaduros. Estos son exportados en cisternas del aparato de Golgi, donde ocurre su maduración (Salanueva y col., 1999), hasta la membrana plasmática para ser liberados al espacio extracelular mediante la fusión de las vesículas que los contienen con la membrana celular.



**Figura 5. Ciclo infeccioso del CoV TGEV.** Por simplificación, sólo se representan las especies de RNA codificantes de polaridad positiva. An, poliA; R, complejo de replicación; VDM, vesículas de doble membrana; RE, retículo endoplasmático; ERGIC, compartimento intermedio; Golgi, aparato de Golgi.



## 2. GENÉTICA REVERSA EN CoV

Durante mucho tiempo la generación de clones infectivos de CoVs ha sido infructuosa debido al gran tamaño del genoma y la existencia de regiones tóxicas en el gen de la replicasa, que impedían el clonaje y crecimiento en bacterias de un cDNA infectivo. Por ello, inicialmente los estudios genéticos en CoV estaban limitados al análisis de mutantes termosensibles (Siddell y col., 2001; Stalcup y col., 1998) y de RNAs defectivos o minigenomas que requieren la presencia de un virus complementador para replicarse (Izeta y col., 1999; Repass y Makino, 1998; Williams y col., 1999). El primer sistema de manipulación genética del genoma completo de CoV fue desarrollado para el MHV y estaba basado en un proceso de recombinación homóloga (Masters, 1999). Sin embargo, este sistema no permite manipular con facilidad el extremos 5' del genoma ni las secuencias próximas al extremo 3' del mismo, por lo que la generación de sistemas de genética reversa que permitan la manipulación de estas regiones es de alto interés.

El primer clon infectivo de CoV se construyó en nuestro laboratorio para el TGEV y fue ensamblado en un cromosoma artificial de bacterias (BAC) bajo el control del promotor inmediatamente temprano de citomegalovirus (CMV) (Almazan y col., 2000). Los BACs permiten el clonaje de hasta 300 kb y aparecen en una o dos copias por célula, reduciéndose al máximo la toxicidad del cDNA viral durante su propagación en bacterias. En este sistema, el RNA viral se transcribe en el núcleo mediante la RNA polimerasa II celular y posteriormente se transloca al citoplasma iniciándose el ciclo infectivo del virus. Esta estrategia ha sido utilizada posteriormente para la generación de clones infectivos del HCoV-OC43 (St-Jean y col., 2006), del SARS-CoV (Almazan y col., 2006) y del FIPV (Bálint y col., 2012).

Además del uso de los BACs, se han desarrollado dos estrategias alternativas para la generación de clones infectivos de CoV. La primera consiste en reconstruir un cDNA de longitud completa bajo el control del promotor del fago T7, mediante la ligación *in vitro* de fragmentos de cDNA que incluyen todo el genoma, y su posterior transcripción *in vitro*. Utilizando esta aproximación se han generado clones infectivos del TGEV (Yount y col., 2000), MHV (Yount y col., 2002), SARS-CoV (Yount y col., 2003) y HCoV-NL63 (Donaldson y col., 2008). La segunda estrategia consiste en la ligación *in vitro* del cDNA de longitud completa bajo el control del promotor del fago T7 y su posterior clonaje en el genoma del virus de la vacuna. Esta estrategia se ha utilizado para generar

clones infectivos del HCoV-229E (Thiel y col., 2001a), MHV (Coley y col., 2005) e IBV (Casais y col., 2001).

### **3. SÍNTESIS DE RNA EN CoV**

La síntesis de RNA en CoV incluye dos procesos claramente diferenciados, la replicación del genoma viral y la transcripción de los sgmRNAs. Ambos procesos son llevados a cabo por el CRT, constituido por las nsps codificadas en el gen de la replicasa y presumiblemente por proteínas celulares (Galan y col., 2009; Sola y col., 2011b; Zuñiga y col., 2010).

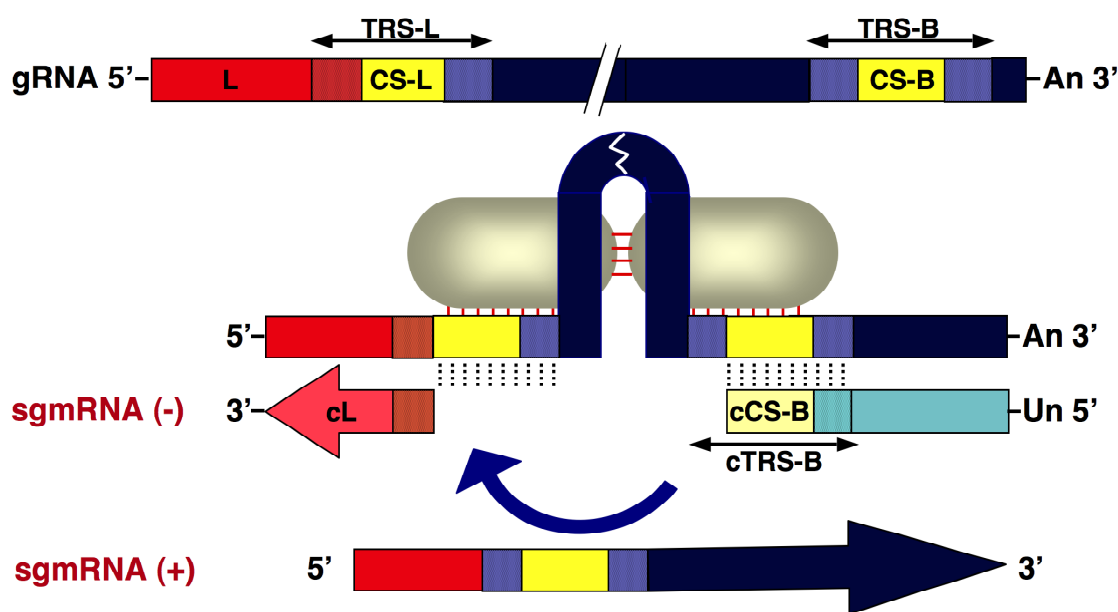
#### **3.1. Transcripción**

Los sgmRNAs de CoV presentan en su extremo 5' la secuencia líder que se encuentra una única vez en el extremo 5' del genoma viral (Fig. 6), lo que implica que su síntesis debe realizarse mediante un proceso discontinuo (Brian y Spaan, 1997; Pasternak y col., 2006; Pasternak y col., 2001; Sawicki y Sawicki, 2005; Sawicki y col., 2007). Los datos experimentales acumulados hasta la fecha indican que el proceso de síntesis discontinua tiene lugar durante la síntesis de la cadena negativa (Alonso y col., 2002; Baric y Yount, 2000; Pasternak y col., 2001; Sawicki y Sawicki, 1998; Sola y col., 2005; van Marle y col., 1999; Zuñiga y col., 2004). La síntesis comenzaría copiando el extremo 3' del genoma hasta alcanzar las distintas TRSs que preceden a cada gen del extremo 3' (TRS-B), las cuales actuarían como señales de parada para la polimerasa viral, probablemente mediante su interacción con el extremo 5' del genoma viral. Una vez copiada la TRS-B se produciría un cambio de molde, el apareamiento con la TRS del líder (TRS-L) y la copia del líder. Finalmente, los sgmRNAs de polaridad negativa generados servirían de molde para la síntesis asimétrica de los sgmRNAs de polaridad positiva (Fig. 6). Este mecanismo de transcripción implica la aproximación en el espacio de regiones distales del genoma, posiblemente mediada por proteínas virales o celulares (Fig. 6) (Curtis y col., 2004; Enjuanes y col., 2006b; Sola y col., 2005; Yount y col., 2006; Zuñiga y col., 2010; Zuñiga y col., 2004).

#### **3.2. Replicación**

A diferencia del mecanismo de transcripción, la replicación es un proceso continuo que tiene lugar por un mecanismo asimétrico a partir de un intermediario de RNA de longitud completa y polaridad negativa que actúa como molde eficiente para la síntesis

de nuevas copias del genoma (Brian y Baric, 2005; Enjuanes y col., 2008b). Teniendo en cuenta el gran tamaño del genoma de CoV (28-30 kb) y la baja fidelidad de las RNA polimerasas dependientes de RNA (RdRp), los CoVs han debido desarrollar mecanismos específicos que contrarresten la alta frecuencia de mutación y garanticen la replicación eficiente del genoma (Gorbalenya y col., 2006).



**Figura 6. Modelo de transcripción de CoV.** El RNA genómico (gRNA) y subgenómico (sgmRNA) de polaridad positiva (+) se muestran con una barra de color azul oscuro, donde se indican la secuencia líder (L) en rojo y las TRSs del líder (TRS-L) y de los genes (TRS-B) en amarillo. La línea curva discontinua representa el plegamiento propuesto que permite la aproximación de secuencias alejadas en el genoma, el cual parece estar mediado por proteínas (óvalos verdes). El sgRNA de polaridad negativa (-) se muestra con una barra de color azul claro, donde se indican las secuencias complementarias del líder (cL) en color rojo claro y las TRSs de los genes (cTRS-B) en amarillo claro.

Se conoce muy poco acerca de las bases moleculares de este proceso y hasta la fecha la mayor parte de los estudios se han realizado utilizando RNAs defectivos o minigenomas que conservan las señales en *cis* necesarias para su replicación en *trans* por un virus complementador (Chang y col., 1994; Dalton y col., 2001; Izeta y col., 1999; Makino y col., 1985; Makino y col., 1988; Méndez y col., 1996; Penzes y col., 1994). Actualmente, la disponibilidad de clones infectivos de varios CoVs permite llevar a cabo este tipo de estudios en el contexto del genoma viral (Almazan y col., 2006; Almazan y col., 2000; Bálint y col., 2012; Casais y col., 2001; Donaldson y col., 2008; St-Jean y col., 2006; Thiel y col., 2001a; Youn y col., 2005; Yount y col., 2000; Yount y col., 2002; Yount y col., 2003). Utilizando RNAs defectivos se han delimitado las secuencias en *cis* necesarias para la replicación de los tres géneros de CoVs (Chang

y col., 1994; Dalton y col., 2001; Izeta y col., 1999; Lin y Lai, 1993; Luytjes y col., 1996; Makino y col., 1990; van der Most y col., 1991; van der Most y Spaan, 1995). En todos los casos estas secuencias residen en los extremos 5' y 3' del genoma, variando su extensión en función del CoV estudiado, siendo de 466-649 nt para el extremo 5' y de 338-492 nt para el extremo 3' (Tabla II). En el caso del TGEV son necesarios los primeros 649 nt del extremo 5' (Escors y col., 2003) y los últimos 492 del extremo 3' más el poliA (Izeta y col., 1999). Los requerimientos de secuencia para la síntesis de la cadena positiva y negativa se han estudiado utilizando un minigenoma derivado del MHV (Lin y col., 1994). Para la síntesis de la cadena positiva son necesarios los primeros 470 nt del extremo 5' y los últimos 460 nt del extremo 3', mientras que para la síntesis de la cadena negativa, solamente se requieren los últimos 55 nt del extremo 3' más el poliA. El requerimiento de secuencias en ambos extremos del genoma para la síntesis de la cadena positiva, sugiere la existencia de una interacción de los extremos del genoma durante la replicación, al igual que ocurre con otros virus RNA de polaridad positiva (Villordo y Gamarnik, 2009; Zhang y col., 2008).

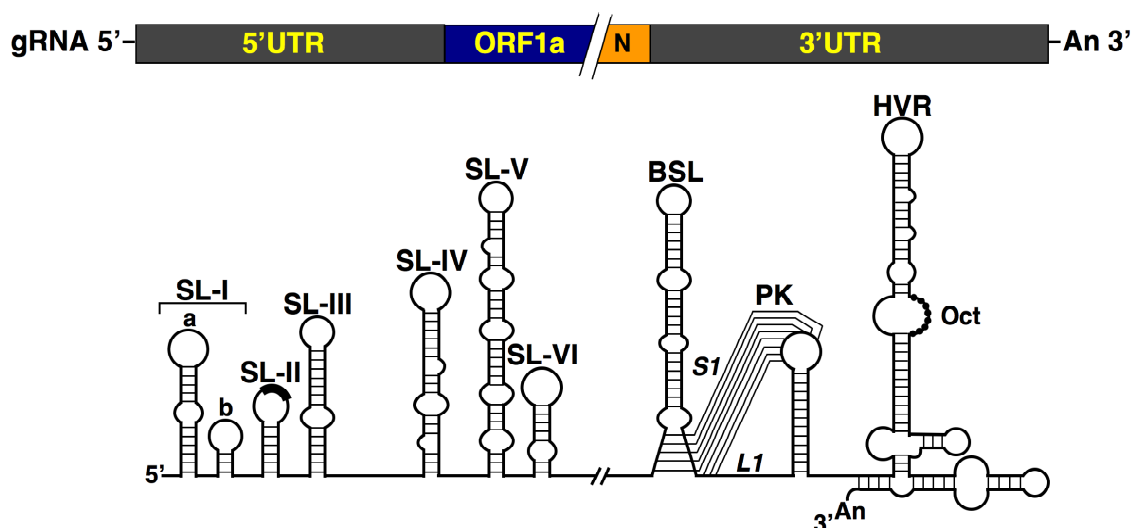
**TABLA II. SECUENCIAS MÍNIMAS NECESARIAS PARA LA REPLICACIÓN DE CoV**

Género	Virus	Extremo 5'	Extremo 3'	Referencias
$\alpha$	TGEV	649	492	Escors y col., 2003; Izeta y col., 1999
$\beta$	MHV	466	436	Lin y Lai, 1993; Luytjes y col., 1996; Makino y col., 1990; van der Most y col., 1991; van der Most y Spaan, 1995
	BCoV	498	ND <sup>(a)</sup> (1637)	Chang y col., 1994
$\gamma$	IBV	544	338	Dalton y col., 2001

(a) ND; no determinado.

En los extremos 5' y 3' del genoma, donde residen las señales necesarias para la replicación, existen superestructuras de RNA, altamente ordenadas, que son esenciales para la replicación del genoma viral (Fig. 7). La identificación y el estudio funcional de estas estructuras se ha realizado fundamentalmente utilizando minigenomas y virus recombinantes del género  $\beta$ . En el extremo 5' se han identificado seis horquillas (*stem-loops*), denominadas SL-I, II, III, IV, V y VI (Brown y col., 2007; Chang y col., 1994; Chang y col., 1996; Chen y Olsthoorn, 2010; Gustin y col., 2009; Raman y col., 2003; Raman y Brian, 2005). Las cuatro primeras se localizan dentro del 5'UTR y están estructuralmente conservadas en todos los CoVs, con la excepción de la SL-II que

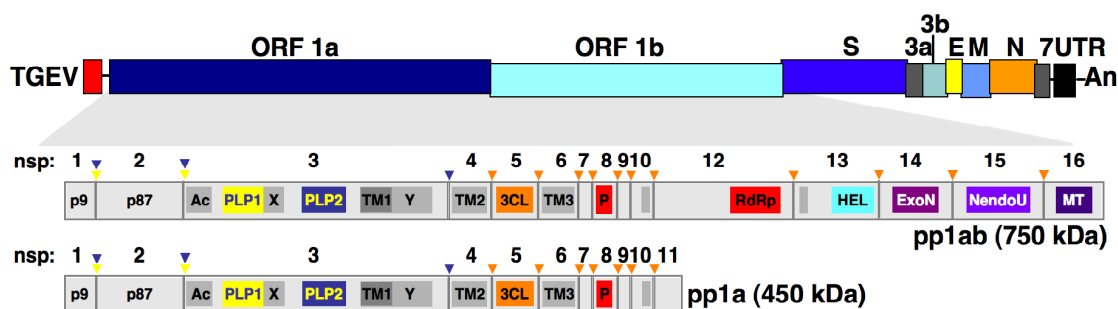
contiene la CS del líder (Kang y col., 2006; Li y col., 2008; Liu y col., 2009; Liu y col., 2007), la cual no está estructurada en otros CoVs (Chen y Olsthoorn, 2010). Por otra parte, las SL-V y SL-VI se encuentran en la secuencia codificante de la ORF1a y están solo parcialmente conservadas en el resto de CoVs. En el extremo 3' se ha demostrado la existencia de 3 superestructuras de RNA altamente ordenadas. La primera es una horquilla de gran complejidad (BSL) que se localiza en el 3'UTR, justo detrás del codón de terminación del gen N (Hsue y col., 2000; Hsue y Masters, 1997). Adyacente al BSL, existe un *pseudoknot* que solapa en 5 nt con el BSL (Goebel y col., 2004a; Williams y col., 1999). Ambas estructuras están conservadas en los CoVs del género  $\beta$  (Goebel y col., 2004b; Hsue y Masters, 1997; Wu y col., 2003). Sin embargo los CoVs del género  $\alpha$  carecen del BSL (Williams y col., 1999) y los del género  $\gamma$  del *pseudoknot* (Dalton y col., 2001), lo que sugiere que los CoVs de estos géneros deben presentar diferencias específicas en el mecanismo de replicación con respecto a los CoVs del género  $\beta$ . Finalmente, existe una región hipervariable altamente estructurada que se encuentra muy poco conservada tanto a nivel de secuencia como de estructura entre los diferentes CoVs (Liu y col., 2001), si bien todos ellos contienen un octanucleótido (GGAAGAGG) altamente conservado.



**Figura 7. Dominios de RNA en los extremos del genoma de CoV del género  $\beta$ .** En la parte superior se muestra el esquema de los extremos del genoma viral. Las estructuras de RNA indicadas están basadas principalmente en estudios realizados con los virus BCoV y MHV. SL, horquilla o *stem-loop*. La CS se muestra en una caja negra sobre el SL-II. BSL, *bulge stem-loop*; PK, *pseudoknot*; S1 y L1, *Stem 1* y *loop 1* del *pseudoknot*; HVR, región hipervariable; Oct, octanucleótido conservado 5'-GGAAGAGG-3'.

#### 4. LA REPLICASA DE CoV

La mayor parte de las actividades virales implicadas en la replicación y transcripción de CoV están codificadas en el gen de la replicasa (Fig. 8), el cual se traduce al inicio de la infección dando lugar a las poliproteínas pp1a y pp1ab, esta última generada mediante un salto de fase del ribosoma. Ambas poliproteínas se autoprocenan de una forma perfectamente regulada en el tiempo, dando lugar a 16 nsps (Schiller y col., 1998), salvo en el caso de los CoVs del género  $\gamma$  que carecen de la nsp1 (Gorbalenya y col., 2006; Ziebuhr, 2005). Los productos maduros derivados del procesamiento de la pp1a (nsp1-nsp11) son comunes con los derivados del procesamiento de la pp1ab (nsp1-nsp10 y nsp12-nsp16) con la excepción de la nsp11, que solo se produce cuando no se da el salto de fase del ribosoma (Fig. 8). Este procesamiento es llevado a cabo por tres cistein-proteasas, la 3CL (nsp5) o proteasa principal, que es responsable de su autoprocenamiento y del corte proteolítico de todas las proteínas situadas a partir de su extremo C-terminal, y dos proteasas similares a papaína (PLP1 y PLP2), que se localizan en la nsp3 y son las responsables del procesamiento de la región amino de las poliproteínas (Fig. 8). En el caso del IBV y del SARS-CoV, solo se ha descrito una PLP activa, la PLP2 (Masters, 2006; Ziebuhr, 2005; Ziebuhr y col., 2000).



**Figura 8. Organización y procesamiento proteolítico de la replicasa del TGEV.** Se muestra un esquema del genoma y de las poliproteínas pp1a y pp1ab del TGEV. Los sitios de procesamiento por las proteasas PLP1, PLP2 y 3CL se indican con triángulos invertidos, amarillos, azules y naranjas, respectivamente. Las nsps están numeradas del 1 al 11 en el caso de la poliproteína pp1a y del 1 al 10 y del 12 al 16 en el caso de la poliproteína pp1ab. P9 y P87, proteínas N-terminales de 9 y 87 kDa, respectivamente; Ac, dominio ácido; PLP1 y PLP2, proteasas accesorias similares a papaína 1 y 2; X, dominio con actividad adenosina difosfato ribosa 1 fosfatasa; Y, dominio que contiene una región transmembrana y un dominio potencial de unión a metales; TM1 a TM3, potenciales dominios transmembrana; 3CL, proteasa principal; P, primasa; RdRp, RNA polimerasa dependiente de RNA; Hel, helicasa; ExoN, exoribonucleasa 3'-5'; NendoU, endoribonucleasa; MT, 2'-O-ribosa metiltransferasa.

Las nsps 1 y 2 se diferencian en secuencia y tamaño entre los CoVs de los géneros  $\alpha$  y  $\beta$  y su función no es del todo conocida. Aunque ambas proteínas son parcialmente dispensables para la replicación del MHV y SARS-CoV, se ha descrito que la nsp1 induce la parada del ciclo celular e inhibe la traducción de los mRNAs celulares y la respuesta inmune innata (Kamitani y col., 2009; Kamitani y col., 2006; Narayanan y col., 2008; Tohya y col., 2009; Wathelet y col., 2007), sugiriendo un papel importante en virulencia. En los CoVs del género  $\alpha$  se ha asociado a la nsp1 un papel funcional similar (Zust y col., 2007). En cuanto a la nsp2, se desconoce su función, aunque se ha descrito que es reclutada en los sitios de síntesis del RNA viral (Hagemeijer y col., 2010) y que su eliminación o mutación produce una disminución del 50% en la síntesis del RNA viral (Graham y Denison, 2006; Graham y col., 2005).

Las nsps 3, 4 y 6 contienen dominios transmembrana y parecen ser las responsables de la formación de las VDMs y de proporcionar el esqueleto molecular para el ensamblaje del CRT en las VDMs (Baliji y col., 2009; Imbert y col., 2008; Kanjanahaluethai y col., 2007; Oostra y col., 2008; Oostra y col., 2007). Además del papel de la nsp3 en la formación de las VDMs y su implicación en el procesamiento de las poliproteínas virales, se ha descrito que una RNA, es un antagonista del IFN y presenta actividad de deubiquitinación (Devaraj y col., 2007; Eriksson y col., 2008; Frieman y col., 2009; Kuri y col., 2011; Saikatendu y col., 2005; Serrano y col., 2007; Snijder y col., 2003; Tan y col., 2009; Thiel y col., 2003a). Sin embargo, se desconoce si interviene directamente en la síntesis del RNA viral (Alvarez y col., 2010; Hurst y col., 2010).

En el extremo C-terminal de la poliproteína pp1a se encuentra un grupo de proteínas pequeñas, nsp7-nsp10, que están implicadas en la síntesis del RNA viral (Deming y col., 2007). Las nsps 7 y 8 forman un complejo hexadecamérico que se une a RNA y presenta propiedades estructurales compatibles con un factor de procesividad de la RdRp (Zhai y col., 2005). La nsp8 tiene actividad RNA polimerasa dependiente de RNA, es independiente de iniciador y probablemente es la responsable de la síntesis de los iniciadores necesarios para la síntesis de RNA mediada por la RdRp viral (Imbert y col., 2006; te Velthuis y col., 2010). La nsp9 es una proteína de unión a RNA de cadena sencilla para la que se ha propuesto un papel en la estabilización de los RNAs virales durante su síntesis y procesamiento (Egloff y col., 2004; Miknis y col., 2009; Sutton y col., 2004). Además, se ha descrito que la nsp9 junto con la nsp8 interaccionan con la RdRp (Brockway y col., 2003). Finalmente, la nsp10 presenta dos dominios de dedos de

zinc, une ácidos nucleicos inespecíficamente (Donaldson y col., 2007; Matthes y col., 2006) y ha sido implicada en la síntesis de RNA viral de polaridad negativa (Siddell y col., 2001).

De forma similar a otros virus con genomas RNA de polaridad positiva, el gen de la replicasa codifica dos proteínas esenciales para la síntesis de RNA, una RdRp (nsp12) y una helicasa de RNA (nsp13). La RdRp de CoV, además de incluir los dominios típicos de dedo, palma y pulgar, presentes en otras RdRps virales, contiene un dominio N-terminal único entre las RdRps virales (Drexler y col., 2010; Gonzalez y col., 2003) y tiene actividad RdRp dependiente de iniciador (Cheng y col., 2005; te Velthuis y col., 2010), el cual parece ser sintetizado por la nsp8. Aunque muchos virus RNA dependen de iniciadores para la síntesis de RNA, los CoVs son los únicos virus RNA conocidos que incorporan en su genoma la enzima responsable de su síntesis. Recientemente, se ha descrito la interacción de la RdRp con la nsp14 en SARS-CoV (Imbert y col., 2008). La helicasa de CoV pertenece a la familia SF1 de helicasas, caracterizadas por ejercer su actividad en la dirección 5'-3' (Ivanov y col., 2004b). Además de la actividad helicasa, la nsp13 de CoV presenta actividad NTPasa y dNTPasa dependiente de RNA y actividad RNA 5'-trifosfatasa, lo que la convierte en la proteína candidata viral para llevar a cabo la etapa inicial de la incorporación del cap en el extremo 5' del genoma.

Finalmente, el gen de la replicasa codifica una serie de enzimas de procesamiento de RNA que no están presentes en otros virus RNA (Gorbalenya y col., 2006; Snijder y col., 2003; Ziebuhr, 2005) y que incluyen una exoribonucleasa 3'-5' (nsp14 o ExoN) (Minskaia y col., 2006), una endoribonucleasa (nsp15 o NendoU) (Ivanov y col., 2004a; Kang y col., 2007; Renzi y col., 2006; Ricagno y col., 2006) y una 2'-O-ribosa metiltransferasa (nsp16 o 2'-O-MT) (Ginalski y col., 2006; von Grotthuss y col., 2003). Teniendo en cuenta el enorme tamaño del genoma de los CoV y la baja fidelidad de las RdRps, estas actividades enzimáticas podrían formar parte de un sistema de reparación que permitiera la replicación fiel del genoma viral, donde la actividad exoribonucleasa tendría un papel central (Eckerle y col., 2010; Eckerle y col., 2007). También, se ha descrito que la ExoN presenta además actividad metiltransferasa (Chen y col., 2009b), por lo que junto con la 2'-O-MT podrían actuar de forma coordinada en la incorporación del cap en el extremo 5' del genoma viral (Decroly y col., 2008).



## 5. PROTEÍNAS CELULARES IMPLICADAS EN LA SÍNTESIS DE RNA DE CoV

Los virus, debido a su limitada capacidad genética, dependen de la célula hospedadora para llevar a cabo muchos de los procesos de su ciclo biológico, y a menudo secuestran y redirigen proteínas celulares para su propia traducción, replicación, transcripción y ensamblaje. En el caso de los virus RNA, la identificación de factores celulares implicados en la replicación viral se ha llevado a cabo mediante estudios de permisividad de determinados tipos celulares para la replicación viral, analizando las proteínas que interaccionan con dominios RNA implicados en replicación, estudiando los factores que se unen a componentes de la replicasa viral y mas recientemente, mediante el uso de técnicas de silenciamiento génico. Por lo general, las proteínas identificadas incluyen proteínas de procesamiento de RNA, factores de transcripción, factores de traducción, proteínas del citoesqueleto y chaperonas celulares, entre otras (Ahlquist y col., 2003; Boguszevska-Chachulska y Haenni, 2005; Lai, 1998; Shi y Lai, 2005).

En CoV la búsqueda de proteínas celulares implicadas en la síntesis de RNA viral ha empezado hace pocos años. La mayoría de ellas han sido identificadas en base a su capacidad de interaccionar *in vitro* con diversos motivos de RNA de importancia funcional en CoVs del género  $\beta$  (MHV y BCoV). Una de las proteínas mas estudiadas es la ribonucleoproteína heterogénea nuclear A1 (hnRNP A1), la cual está implicada en *splicing*. La hnRNP A1 se une a la cadena complementaria de las TRSs (Zhang y col., 1999), incluyendo la del líder, y a la región 3' UTR de la cadena positiva. Existen datos experimentales que sugieren un papel importante de la hnRNP A1 en la síntesis de RNA de CoV. Su sobreexpresión favorece la síntesis de RNA viral, mientras que la expresión de una forma truncada de la proteína tiene un efecto dominante negativo sobre la síntesis de RNA viral (Shi y col., 2000). Además, la proteína se relocaliza en los sitios de síntesis de RNA viral en el citoplasma de células infectadas por el MHV (Li y col., 1997) y la mutación de los sitios de unión en el RNA viral reduce la replicación y transcripción de varios minigenomas del MHV (Huang y Lai, 2001).

Otras proteínas de la familia de las hnRNPs identificadas por su interacción con el genoma del MHV son la hnRNP Q y la proteína de unión a trectos de polipirimidinas (PTB o hnRNP I). La hnRNP Q o SYNCRIP se une tanto a la región 5' UTR como a su secuencia complementaria y en el caso de MHV se ha descrito que su silenciamiento induce un retraso en la síntesis de RNA viral y en la formación de sincitios (Choi y col.,

2004). Por otra parte, la PTB se une específicamente a las TRSs (Li y col., 1999) y a la cadena complementaria de la secuencia 3' UTR (Huang y Lai, 1999), justo en los sitios complementarios a los que se une la hnRNP A1. Datos previos con MHV mostraron que la mutación en la TRS del líder de los sitios de interacción con la PTB afectaba negativamente a la síntesis del RNA viral (Choi y col., 2002; Li y col., 1999), sugiriendo un papel de la PTB en transcripción. Sin embargo, no se puede descartar que el efecto observado en la síntesis de RNA viral sea debido a que al mutar los sitios de interacción de la PTB se están afectado también los sitios de unión de la hnRNP A1. De hecho, estudios recientes realizados en TGEV utilizando RNAs de interferencia (siRNAs) han mostrado que la PTB es un factor negativo para la síntesis del RNA viral (Sola y col., 2011a). Finalmente, se ha descrito que la PTB junto con la hnRNP A1 forman un complejo *in vitro* con los extremos 5' y 3' del genoma (Huang y Lai, 2001), por lo que se ha postulado que estas proteínas podrían estar implicadas en la posible interacción de los extremos del genoma durante el proceso de replicación del genoma viral.

Además de las hnRNPs, se han identificado otras proteínas celulares que se unen de forma específica al 3'UTR del genoma del BCoV y del MHV, como la proteína de unión a secuencias de poliadenina (PABP), la aconitasa mitocondrial y las proteínas de choque térmico (HSPs) HSP40, HSP60 y HSP70. Aunque existen algunas evidencias experimentales que sugieren la implicación de estas proteínas en la síntesis de RNA de CoV (Nanda y col., 2004; Nanda y Leibowitz, 2001; Spagnolo y Hogue, 2000), su papel directo en la misma todavía no ha sido demostrado.

Una aproximación alternativa para la identificación de proteínas celulares implicadas en la síntesis de RNA de CoV consiste en el estudio de las proteínas que interaccionan con componentes de la replicasa viral. Mediante ensayos de doble híbrido y coimmunoprecipitación se ha determinado que las helicasas celulares de RNA DDX5 y DDX1 interaccionan específicamente con la nsp14 (ExoN) y nsp13 (helicasa) del SARS-CoV, respectivamente, y que su silenciamiento génico mediante siRNAs afecta significativamente a la síntesis de RNA viral (Chen y col., 2009a; Xu y col., 2010).



## **IV. OBJETIVOS**

El objetivo principal de este trabajo consiste en la identificación de las proteínas virales y celulares que forman el CRT de CoV, utilizando como modelos experimentales los virus TGEV y SARS-CoV. Estos estudios permitirán en último término reconstituir un sistema de replicación *in vitro* que facilite el estudio de las bases moleculares de la replicación de CoV y aplicar los conocimientos obtenidos al desarrollo de antivirales y vacunas frente a CoV. Los objetivos específicos abordados en esta tesis son los siguientes:

- 1.- Generación de un replicón del SARS-CoV en un cromosoma artificial de bacterias con el fin de identificar las proteínas virales implicadas en replicación mediante genética reversa.
- 2.- Estudio del papel en la replicación de CoV de las enzimas de procesamiento de RNA, exoribonucleasa, endoribonucleasa y 2'-O-ribosa metiltransferasa, utilizando el replicón generado.
- 3.- Caracterización de la RdRp y las nsps 2, 3, 5 y 8 del CRT de CoV.
- 4.- Identificación de proteínas celulares implicadas en la replicación de CoV, en base a su interacción con los extremos del genoma o con la RdRp. Análisis de la relevancia funcional de las proteínas identificadas mediante silenciamiento génico con siRNAs.
- 5.- Estudio de la incorporación en la partícula viral de proteínas virales y celulares que forman el CRT de CoV.



## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. CÉLULAS EUCARIÓTICAS

### 1.1. Líneas celulares

La línea celular epitelial ST (McClurkin y Norman, 1966), derivada de testículo embrionario de cerdo, se obtuvo del laboratorio del Dr. L. Kemeney (National Animal Disease Center, Iowa, EEUU). La línea celular 293T (HEK293T/17), derivada de la línea celular de riñón humano 293 transformada establemente con el antígeno T de SV40, se obtuvo de la *American Type Culture Collection* (ATCC CRL-11268). La línea celular BHK-pAPN (Delmas y col., 1992), derivada de la línea epitelial de riñón de hámster BHK-21 (ATCC CCL10) transformada establemente con la pAPN (receptor del TGEV), fue cedida por el Dr. H. Laude (Unidad de Virología e Inmunología Molecular, Jouy-en-Joses, Francia). La línea celular derivada de hepatocarcinoma humano, Huh-7, fue cedida por el Dr. R. Bartenschlager (Departamento de Virología Molecular, Universidad de Heidelberg, Alemania). La línea celular H5 (High Five), derivada de células de ovario de *Trichoplusia ni*, se obtuvo del laboratorio del Dr. A. Alcami (Centro de Biología Molecular-Severo Ochoa, Madrid, España).

### 1.2. Cultivo de células eucarióticas

Las células ST, 293T y Huh-7 se crecieron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 7% y una humedad del 98% en medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEN) (Gibco) suplementado con aminoácidos no esenciales al 1% (Sigma), suero fetal de ternera (SFT) (Bio-Whittaker Europe) al 10%, 2 mM L-glutamina (Sigma) y 50 mg/ml de gentamicina (Sigma). En el caso de las células BHK-pAPN se usó SFT al 5% y cada dos pases se crecieron en presencia del antibiótico de selección genética (G418) (Sigma) a una concentración de 1.5 mg/ml.

Las células H5 se crecieron a 29°C en medio TC100 (Gibco) suplementado con SFT al 10% (Bio-Whittaker Europe), 50 mg/ml de gentamicina (Sigma), 0.25 mg/ml de fungizona (Sigma), 0.1 mg/ml de penicilina/streptomycin (Sigma) y antimicótico al 0.02% (Sigma).

Todas las líneas celulares se almacenaron mediante congelación en nitrógeno líquido a una densidad de 1-2 x 10<sup>6</sup> células/ml en dimetil sulfoxido (DMSO) (Sigma) al 10% en SFT.



## **2. VIRUS**

### **2.1. Aislados virales**

El aislado PUR46-MAD del TGEV (código de acceso del GenBank, AJ271965) (Almazan y col., 2000; Penzes y col., 2001; Sanchez y col., 1990) se aisló en nuestro laboratorio a partir del aislado Purdue (Doyle y Hutchings, 1946), el cual fue cedido por el Dr. E. H. Bohl (Ohio State University, Ohio, EEUU).

El aislado PUR46-C11 del TGEV (Sanchez y col., 1999), que presenta la misma secuencia que el aislado PUR46-MAD con la excepción del gen S, se aisló en nuestro laboratorio a partir del aislado PUR46-SW11, el cual fue cedido por el Dr. M. Pensaert (Gante, Bélgica).

Para la construcción del replicón del SARS-CoV se utilizó la secuencia del aislado Urbani (Rota y col., 2003), depositada en el GenBank con el código de acceso AY278741. El clonaje del cDNA del replicón se realizó utilizando el RNA viral obtenido del *Center for Disease Control* (CDC) de Atlanta (USA). La manipulación del replicón del SARS-CoV se realizó en el laboratorio de nivel 3 de bioseguridad biológica del Instituto Nacional de Salud Carlos III (Madrid, España) siguiendo los protocolos marcados por la Unión Europea.

### **2.2. Crecimiento y titulación del TGEV**

Los dos aislados del TGEV, PUR46-MAD (Sanchez y col., 1990) y PUR46-C11 (Sanchez y col., 1999), se crecieron y titularon en células ST según lo descrito previamente (Correa y col., 1988). Para la generación de los lotes o *stocks* de virus, las células ST se infectaron a una multiplicidad de infección (mdi) de 0.1-1 unidades formadoras de placa (UFP) por célula. El sobrenadante de esta infección se recogió a las 24 h después de la infección (hdi) y se almacenó a -70°C hasta su utilización.

El aislado PUR46-MAD se utilizó para infectar células BHK-pAPN y ST, mientras que el aislado PUR46-C11 se utilizó para infectar células Huh-7.

### **2.3. Purificación de viriones del TGEV**

Las células ST se infectaron con el aislado PUR46-MAD a una mdi de 5 UFP/célula. A las 24 hdi, los sobrenadantes se recogieron y se clarificaron por centrifugación a 6000g durante 20 min a 4°C. El virus clarificado se sedimentó por ultracentrifugación a través de un colchón de sacarosa al 31% en tampón TEN (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 M NaCl) a 112000g durante 2 h a 4°C, se resuspendió en tampón TEN

con Tween-20 al 0.05% y se centrifugó a través de un gradiente continuo de sacarosa del 30% al 42% en tampón TEN a 112000g durante 2 h a 4°C. El gradiente se fraccionó desde el fondo y las fracciones que contenían virus se identificaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y tinción con el reactivo *EZBlue Gel Staining Reagent* (Sigma), siguiendo las instrucciones del proveedor. Las fracciones con virus se juntaron, se diluyeron en tampón TEN y se centrifugaron a 107000g durante 1 h a 4°C. Los viriones se resuspendieron en tampón TNE (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) y la concentración de proteína se determinó utilizando el reactivo *BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit* (Pierce) siguiendo las indicaciones del fabricante. El virus purificado se usó inmediatamente o se congeló a -70°C hasta su uso.

## **2.4. Tratamiento con proteasa K de viriones purificados del TGEV**

30 µg de viriones purificados se trataron con 300 ng de proteasa K (Roche) en un volumen final de 450 µl, durante 30 min a 25°C con agitación suave. Una vez finalizada la reacción, la proteasa K se inactivó mediante incubación con 5 mM del inhibidor de proteasa K *Pefabloc SC* (Sigma) durante 5 min a 4°C. Los viriones tratados con proteasa K se sedimentaron por ultracentrifugación a través de 2 ml de un colchón de sacarosa al 31% en tampón TEN a 112000g durante 1 h a 4°C, se resuspendieron en tampón de Laemmli (60 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 0.1 M DTT, 10% glicerol) y se congelaron a -70°C hasta su análisis.

## **3. BACTERIAS**

### **3.1. Cepas y cultivos de bacterias**

La cepa DH10B de *E.coli* (Gibco), cuyo genotipo es F<sup>-</sup> *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Ø80*dlacZ*ΔM15 Δ*lacX74 deoR recA1 endA1 araD139* Δ(*ara, leu*)7697 *galU galK λ-rpsL nupG*, se utilizó de rutina para el clonaje de DNA y la amplificación de plásmidos. Para la generación de bácmidos infectivos de baculovirus, se utilizó la cepa DH10Bac de *E.coli* (Invitrogen) (Luckow y col., 1993).

Los cultivos bacterianos se crecieron en medio líquido LB (medio Luria-Bertani) o en placas de LB-agar a 30°C ó a 37°C, según se indique (Sambrook y Russell, 2001). El medio se suplementó con los antibióticos adecuados en cada caso cuando fue necesario (13 µg/ml de cloranficol, 150 µg/ml de ampicilina, 50 µg/ml de kanamicina, 7 µg/ml de gentamicina y 10 µg/ml de tetraciclina).

### **3.2. Preparación de bacterias competentes**

Las bacterias DH10B competentes para electroporación se prepararon a partir de una colonia única crecida en medio sólido, que se amplificó posteriormente a 37°C en un litro de medio SOB (2% triptona, 0.5% extracto de levadura, 8.6 mM NaCl, 6.7 mM KCl) hasta alcanzar una DO<sub>550</sub> de 0.7. A continuación, el cultivo se enfrió a 4°C durante 20 min, las bacterias se sedimentaron por centrifugación a 4000g durante 15 min a 4°C y se lavaron tres veces con una solución previamente enfriada a 4°C de glicerol al 10%, utilizando un volumen del cultivo inicial para el primer lavado y reduciendo el volumen a la mitad en los lavados sucesivos (1 l, 0.5 l y 0.25 l, respectivamente). En cada lavado las bacterias se resuspendieron a 4°C y se centrifugaron a 4000g durante 15 min a 4°C. El sedimento final se resuspendió en 3 ml de glicerol al 10% enfriado a 4°C, se repartió en alícuotas y se congeló a -70°C hasta su utilización.

Las bacterias DH10Bac competentes para transformar por choque térmico se prepararon por el método del cloruro de rubidio (Sambrook y Russell, 2001). Bacterias DH10Bac procedentes de una colonia aislada crecida en medio sólido, se crecieron a 37°C en 1 l de medio LB suplementado con kanamicina (50 µg/ml) y tetraciclina (10 µg/ml) hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> entre 0.3 y 0.8. A continuación el cultivo se enfrió a 4°C durante 20 min, las bacterias se sedimentaron por centrifugación a 4000g durante 15 min a 4°C, se resuspendieron en 1 l de RF1 (100 mM RbCl<sub>2</sub>, 20 mM KAc, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 15% Glicerol, pH 5.8) y se incubaron durante 15 min a 4°C. Posteriormente, se sedimentaron como se ha indicado anteriormente, se resuspendieron en 100 ml de RF2 (10 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 15% Glicerol, pH 6.5), se incubaron durante 15 min a 4°C y se repartieron en alícuotas que se congelaron a -70°C hasta su utilización.

### **3.3. Transformación de bacterias competentes**

Las bacterias DH10B se transformaron por electroporación con 20-40 ng de DNA diluido en 50 µl de agua. El DNA diluido se calentó a 65°C durante 10 min, se enfrió a 4°C y se mezcló con 50 µl de bacterias competentes. La mezcla se incubó durante 1 min a 4°C y se transfirió a una cubeta de electroporación de 0.2 cm (Bio-Rad), donde se aplicó un pulso de 25 µF, 2.5 kV y 200 Ω utilizando un electroporador *GenePulser* (Bio-rad). Las bacterias se resuspendieron en 1 ml de medio SOC (SOB + 20 mM glucosa) (Hanahan, 1985), se incubaron a 37°C con agitación durante 45 min y se sembraron sobre placas de LB-agar con el antibiótico apropiado.

Las bacterias DH10Bac se transformaron mediante choque térmico (Hanahan, 1985) con 150 ng de los plásmidos intermedios pFastBac que contenían las diferentes versiones de la RdRp. El DNA plasmídico se mezcló con 50 µl de bacterias competentes y se incubó durante 30 min a 4°C. A continuación, se dio un choque térmico a 42°C durante 45 seg, se añadió 1 ml de medio SOC y las bacterias se incubaron a 37°C con agitación durante 4 h. Finalmente, las bacterias se plaquearon en placas de LB-agar con 50 µg/ml de kanamicina, 7 µg/ml de gentamicina, 10 µg/ml de tetraciclina, 100 µg/ml de bluo-gal (Invitrogen) y 40 µg/ml de IPTG (Sigma).

## **4. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL DNA**

### **4.1. Plásmidos**

#### **4.1.1 Plásmidos de bajo número de copias**

El plásmido pBeloBAC11 (Wang y col., 1997), que contiene el origen de replicación del factor F de *E. coli* (*oriS*), el gen de resistencia a cloranfenicol y los genes necesarios para mantener una sola copia del plásmido por célula (*parA*, *parB*, *parC* y *repE*), se utilizó para la construcción del replicón del SARS-CoV.

#### **4.1.2. Plásmidos de alto número de copias**

El plásmido pFastBacHTB (pFBHT) fue adquirido a Invitrogen y se utilizó para la generación de baculovirus recombinantes que expresaban bajo el control del promotor de la polihedrina de baculovirus, diferentes versiones de la RdRp del TGEV fusionadas en su extremo N-terminal a una cola de seis residuos de histidina (6xHis) y la secuencia de corte para la proteasa del *Tobacco Etch Virus* (TEV).

El plásmido pcDNA3-TAP (pcTAP) se obtuvo del laboratorio del Profesor J. Ortín (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, España) y se utilizó para expresar en células de mamífero la RdRp viral fusionada en su extremo C-terminal al dominio TAP, constituido por el péptido de unión a calmodulina, el sitio de procesamiento de la proteasa TEV y la proteína A (Puig y col., 2001).

El plásmido pcDNA3.1(-) (Invitrogen) se utilizó para expresar en células de mamífero los diferentes fragmentos de la RdRp utilizados para el mapeo epitópico de los anticuerpos monoclonales generados.

El plásmido pGBT9 fue adquirido a Clontech y se utilizó para expresar en levaduras la RdRp fusionada al dominio de unión del factor de la transcripción GAL4.

#### **4.2. Electroforesis de DNA en geles de agarosa**

La separación preparativa y analítica de fragmentos de DNA se llevó a cabo con geles de agarosa *D-1 Media EEO* (Pronadisa) al 0.65-1.2% en TAE (10 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) con 1 µg/ml de bromuro de etidio. Para la resolución y purificación de fragmentos de pequeño tamaño (< 200 pb) se utilizaron geles de agarosa *NuSieve GTG* (Cambrex) al 3% en TBE (45 mM Tris-borato, 1mM EDTA).

#### **4.3. Preparación y purificación de DNA plasmídico**

Para la purificación de plásmidos a partir de cultivos bacterianos a pequeña, media o gran escala, se utilizaron los reactivos *Plasmid mini, midi o maxi Kit* (Qiagen), respectivamente, siguiendo las indicaciones del fabricante con las modificaciones adecuadas en función del tamaño y número de copia del plásmido. En el caso de preparaciones ultrapuras de plásmidos basados en BACs, estas se realizaron utilizando el reactivo *Large Construct Kit* (Qiagen).

Para la purificación de DNA a partir de reacciones enzimáticas, de fragmentos de DNA extraídos de geles de agarosa o de productos amplificados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizó el reactivo *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) o el reactivo *QIAEX II Gel Extraction Kit* (Qiagen) en el caso de fragmentos mayores de 10 kb, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante en cada caso.

#### **4.4. Enzimas de restricción y modificación de DNA**

Las enzimas de restricción y modificación de DNA (DNA ligasa del fago T4, fosfatasa alcalina de gamba, etc....) se adquirieron a Roche o New England Biolabs. Todos los tratamientos enzimáticos se hicieron siguiendo protocolos estándar (Sambrook y Russell, 2001) y las indicaciones del fabricante.

#### **4.5. Amplificación de DNA mediante PCR**

Las reacciones de PCR con fines analíticos se realizaron con 0.5 U de la enzima *AmpliTaq DNA polymerase* (Applied Biosystems) en un volumen de reacción de 50 µl, en presencia de 20 pmoles de los oligonucleótidos correspondientes, una mezcla de deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) a una concentración final de 0.25 mM, 1.25 mM MgCl<sub>2</sub> y el tampón específico suministrado por el fabricante. En las reacciones de PCR la temperatura de hibridación se ajustó a 10°C por debajo de la temperatura de fusión (tm) de los oligonucleótidos y el tiempo de enlongación fue de 1 min/kb de DNA a

amplificar. En el caso de la amplificación de fragmentos mayores de 3 kb, se utilizó la enzima *Expand High Fidelity* (Roche) siguiendo las indicaciones del fabricante.

La amplificación de fragmentos de DNA con fines preparativos se realizó con 2.5 U del enzima *Platinum Pfx DNA polymerase* (Invitrogen), según las indicaciones del proveedor.

#### **4.6. Transfección de DNA**

Para analizar la funcionalidad de los replicones del SARS-CoV, células 293T o BHK-pAPN sembradas en placas de 35-mm de diámetro al 90-95% de confluencia en medio DMEN con 10% SFT y sin antibióticos, se transfectaron con 4 µg de DNA y 12 µl de *Lipofectamina 2000* (Invitrogen) según las especificaciones del fabricante.

Para analizar la expresión de la RdRp fusionada al dominio TAP, células 293T crecidas en placas de 100-mm de diámetro al 90% de confluencia en medio DMEN con 10% SFT y sin antibióticos, se transfectaron con 28 µg de DNA utilizando el método del fosfato cálcico (Chen y Okayama, 1987) o con 50 µl de *Lipofectamina 2000* (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Con el fin de obtener baculovirus recombinantes, células H5 sembradas en placas de 60-mm de diámetro al 80% de confluencia en medio TC100 con 10% de SFT y sin antibióticos, se transfectaron con 1 µg de los bácmidos recombinantes y 5 µl de *Cellfectin* (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante.

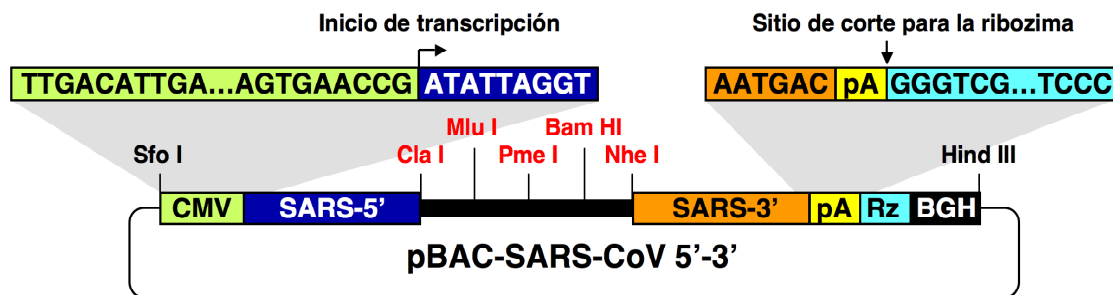
En todos los casos la eficiencia de transfección se analizó por citometría de flujo usando el plásmido pSinDUAL-eGFP/eGFP, el cual expresa la proteína GFP. Para ello, las células transfectadas se levantaron con una solución de tripsina/EDTA y se lavaron con 5 volúmenes de PBS. El medio de lavado se retiró y el porcentaje de células fluorescentes se determinó utilizando un citómetro de flujo *Cell Coulter Epics XL-MCL*.

### **5. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES**

#### **5.1. Construcción del plásmido pBAC-SARS-CoV 5'-3'**

El plásmido pBAC-SARS-CoV 5'-3' (Fig. 9) constituye la base para la construcción del replicón de la cepa Urbani del SARS-CoV. Este plásmido contiene los primeros 681 nt del genoma viral bajo el control del promotor del CMV, un sitio múltiple de clonaje con los sitios de restricción Cla I, Mlu I, Pme I, Bam HI y Nhe I, y los últimos 975 nt del genoma viral seguidos de un poliA de 25 nt, la ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV) y las secuencias de terminación y poliadenilación de la hormona de

crecimiento bovina (BGH). El extremo 5' del genoma fusionado al promotor del CMV se generó mediante PCRs solapantes. En una primera etapa se amplificó el promotor del CMV con los oligonucleótidos CMV5' (introduce un sitio Sfo I en el extremo 5') y CMV3' (contiene los primeros 21 nt del extremo 5' del genoma viral) (Tabla III) y los primeros 681 nt del genoma viral, flanqueado en el extremo 3' por los sitios de restricción Mlu I, Pme I y Bam HI, utilizando los oligonucleótidos URB-1VS y URB-653RS (Tabla III). Ambos productos de PCRs solapantes se usaron como molde en una segunda PCR con los oligonucleótidos CMV5' y URB-653RS, generando un DNA que contenía el promotor del CMV fusionado al extremo 5' del genoma. Este producto de PCR se digirió con Sfo I y Bam HI y se clonó en el plásmido pBelloBAC11 digerido con las mismas enzimas, generando el plásmido pBAC-SARS-CoV 5'. Por otra parte, utilizando los oligonucleótidos URB-28747VS, URB-3'RS, URB-3'pA y BGH-3'RS (Tabla III), se generó un fragmento de DNA que contenía los últimos 975 nt del genoma fusionados al poliA, la ribozima del HDV y las señales de terminación y poliadenilación de la BGH, siguiendo un procedimiento similar al descrito para el extremo 5' del genoma. El producto final de PCR se digirió con Bam HI y Hind III y se clonó en el plásmido pBAC-SARS-CoV 5' digerido con las mismas enzimas, generando el plásmido pBAC-SARS-CoV 5'-3'.



**Figura 9. Generación del plásmido pBAC-SARS-CoV 5'-3'.** Este plásmido incluye los primeros 681 nt del genoma viral (SARS-5', en azul) bajo el control del promotor del CMV, un sitio múltiple de clonaje con las enzimas de restricción seleccionadas (en rojo) para la construcción del replicón y los últimos 975 nt del genoma (SARS-3', en naranja) seguidos por un poliA (pA) de 25 nt, la ribozima del virus del HDV (Rz) y las secuencias de terminación y poliadenilación de la BGH (BGH). Se indican el inicio de la transcripción por el promotor del CMV y el sitio de corte de la ribozima del HDV.

TABLA III. OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS PARA LA GENERACIÓN DEL PLÁSMIDO pBAC-SARS-CoV 5'-3'

Oligonucleótido <sup>(a)</sup>	Secuencia 5' – 3' <sup>(b)</sup>	Posición <sup>(c)</sup>
CMV5'	GCCTCGATCCTAAGGCGCCTAAGTTGACATTGATTATTGAC TAGTTATTAATAG	-
CMV3'	GGGTAGGTAAAAACCTAATATACGGTTCATAAACGAGC TCTGCTT	-
URB-1VS	ATATTAGGTTTTACCTACCCAGGAAAAGCCAACC	1-35
URB-653RS	CGGCGGATCCTGGCGTTTAAACCAGGACGCGTGGTTATC GATGCCATAGCTATGACCACCGGCTC	653-676
URB-28747VS	CGGCGGATCCCGAATGGCTAGCGGAGGTGGTGAAAC	28747-28773
URB-3'RS	GTCATTCTCCTAAGAAGCTATTAAAATCAC	29698-29727
URB-3'pA	TAGCTTCTTAGGAGAATGACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAA	29708-29751
BGH-3'RS	GCCTACCAAGCTTCCGCGGACATGTACAGAGCTCGAGCT CTCCCCA	-

(a) Vs, sentido viral o polaridad positiva; RS, sentido antiviral o polaridad negativa.

(b) Las secuencias en cursiva se añadieron para facilitar la restricción del fragmento amplificado. Las bases subrayadas indican dianas de restricción. Las secuencias sombreadas en gris indican la región donde solapan las PCRs.

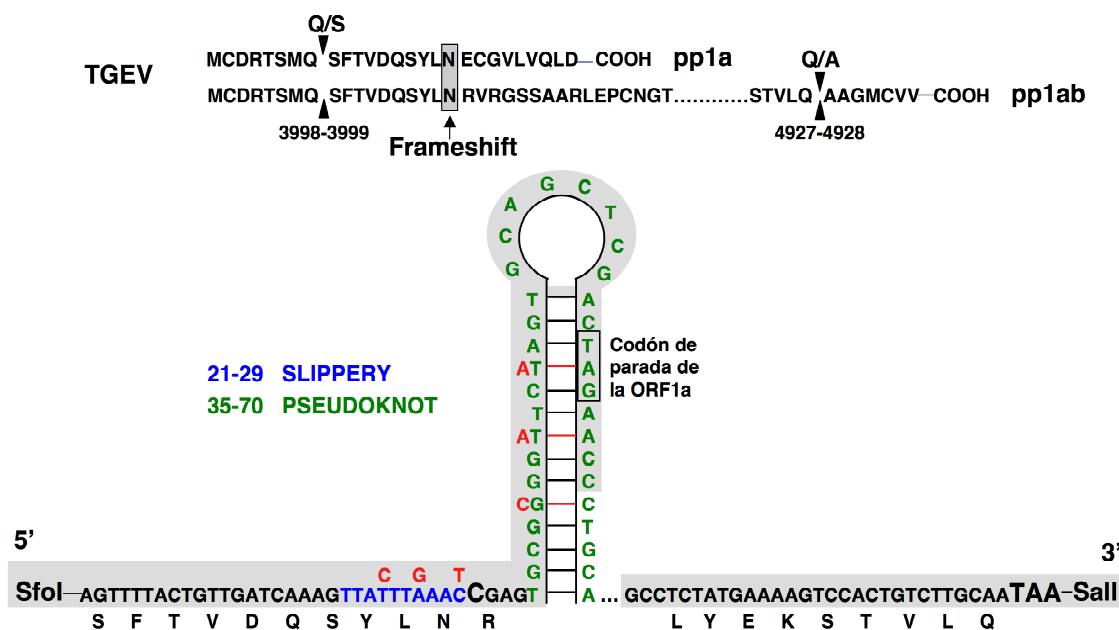
(c) Posición en el genoma del SARS-CoV. En los oligonucleótidos de sentido inverso se indica la posición de la secuencia complementaria.

## 5.2. Construcción de los plásmidos pFBHT-RdRp y pFBHT-RdRpDDAA

El plásmido pFBHT-RdRp contiene la secuencia codificante de la RdRp del TGEV fusionada en su extremo N-terminal a una cola de 6xHis bajo el control del promotor de la polihedrina de baculovirus. La secuencia codificante de la RdRp está comprendida entre los nucleótidos 12304 y 15094 del genoma del TGEV (aa 3999-4927 de la pp1ab), coincidiendo con los sitios de procesamiento de la pp1ab predichos para la proteasa 3CL (Fig. 10). La secuencia codificante de la RdRp se amplificó por PCR a partir del plásmido pBAC-TGEV<sup>FL</sup> (Almazan y col., 2000) utilizando los oligonucleótidos RdRp1VS y RdRp1RS, los cuales introducían un sitio de restricción Sfo I en el extremo 5' y dos codones de terminación seguidos por un sitio Sal I en el extremo 3' (Tabla IV). En la secuencia amplificada se encuentra la señal responsable del *frameshift*, constituida por una secuencia *slippery* y un *pseudoknot* (Brierley y col., 1987), que permite la expresión de la poliproteína pp1ab (Gorbalenya y col., 1989; Ziebuhr, 2005; Ziebuhr y col., 2000). Con el fin de inactivar el *frameshift*, la secuencia del oligonucleótido RdRp1VS contenía 6 mutaciones silenciosas que destruían la secuencia de *slippery* (T>C, A>G, C>T) y el *pseudoknot* (G>C, T>A, T>A), así como la inserción de un nucleótido (C) que permitía traducir la fase correcta (Fig. 10). El producto de PCR



generado se digirió con Sfo I y Sal I y se clonó en el plásmido pFBHT digerido con las mismas enzimas, generando el plásmido pFBHT-RdRp.



**Figura 10. Eliminación del frameshift presente en la secuencia codificante de la RdRp del TGEV.** En la parte superior se muestran los sitios de procesamiento de la poliproteína pp1ab (puntas de flecha) que dan lugar a la RdRp, así como el sitio donde tiene lugar el frameshift. En la parte inferior de la figura se muestra la secuencia y estructura de la secuencia de *slippery* (nucleótidos en azul) y del *pseudoknot* (nucleótidos en verde), así como las mutaciones silenciosas introducidas (nucleótidos en rojo), la inserción de una C justo después de la secuencia de *slippery* y el codón de terminación (TAA) introducido al final de la secuencia codificante de la RdRp.

Con el fin de reducir la posible toxicidad en células de insecto de la RdRp, se generó una versión inactiva de la misma, mutando su centro catalítico. Para ello los residuos de Asp en las posiciones 4656 y 4657 (Gorbalenya y col., 1989; Koonin, 1991), se sustituyeron por Ala mediante PCRs solapantes usando los oligonucleótidos RdRp2VS, RdRp2RS, RdRp3VS y RdRp3RS (Tabla IV) y el plásmido pFBHT-RdRp como molde. El producto final de PCR, flanqueado por los sitios de restricción Sfo I en el extremo 5' y Sal I en el extremo 3', se digirió con Sfo I y Sal I y se clonó en el vector pFBHT en fase con la cola de 6xHis, generando el plásmido pFBHT-RdRpDDAA.

### 5.3. Construcción de los plásmidos pcDNA-F1, F2, F3 y F4

Con el fin de mapear la región de la RdRp reconocida por los anticuerpos monoclonales (Acms) generados en esta tesis, la secuencia codificante de la RdRp se dividió en 4 fragmentos solapantes (F1-F4) atendiendo a los dominios estructurales predichos para la RdRp (N-Pol, dedos, palma y pulgar). El fragmento F1 codifica los

primeros 263 aa de la RdRp, el F2 abarca desde el aa 200 al 424, el F3 desde el 402 al 640 y el F4 desde el 606 al 929. Estos fragmentos se amplificaron por PCR a partir del plásmido pFBHT-RdRp utilizando los oligonucleótidos específicos RdRp-F1VS y RdRp-F1RS para el F1, RdRp-F2VS y RdRp-F2RS para el F2, RdRp-F3VS y RdRp-F3RS para el F3 y RdRp-F4VS y RdRp-F4RS para el F4 (Tabla IV). En todos los casos los oligonucleótidos fueron diseñados para introducir un sitio Xho I y un codón de iniciación en el extremo 5' y dos codones de terminación y un sitio Bam HI en el extremo 3' (Tabla IV). Los productos de PCR generados se digirieron con las enzimas de restricción Xho I y Bam HI y se clonaron en el plásmido pcDNA3.1(-) (Invitrogen) digerido con las mismas enzimas, generando los plásmidos pcDNA-F1, F2, F3 y F4.

#### 5.4. Construcción del plásmido pcTAP-RdRp

El plásmido pcTAP-RdRp se generó con el objetivo de analizar las proteínas celulares que interaccionan con la RdRp mediante la tecnología del TAP (*Tandem affinity purification*) (Puig y col., 2001). Para ello, la secuencia codificante de la RdRp se amplificó por PCR a partir del plásmido pFBHT-RdRp utilizando los oligonucleótidos RdRp4VS y RdRp4RS, los cuales introducen un sitio Bam HI y un codón de iniciación en el extremo 5' y un sitio Xho I en el extremo 3' (Tabla IV). El producto de PCR generado se digirió con Bam HI y Xho I y se clonó en fase con el dominio TAP en el plásmido pcDNA3TAP digerido con las mismas enzimas, generando el plásmido pcTAP-RdRp.

#### 5.5. Construcción del plásmido pGBT9-RdRp

El plásmido pGBT9-RdRp se generó con el fin de identificar proteínas celulares que interaccionen con la RdRp mediante la técnica de doble híbrido en levaduras (O'Reilly y col., 1997; Xu y col., 2010). Para ello, la secuencia codificante de la RdRp se amplificó por PCR a partir del plásmido pFBHT-RdRp utilizando los oligonucleótidos RdRp5VS, que introduce un sitio Sma I en el extremo 5', y RdRp1RS que introduce dos codones de terminación y un sitio Sal I en el extremo 3' (Tabla IV). El producto de PCR se digirió con Sma I y Sal I y se clonó en fase con el dominio de unión del factor de transcripción GAL4 en el vector pGBT9 (Clontech) digerido con las mismas enzimas.

TABLA IV. OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS PARA EL CLONAJE DE LA RdRp DEL TGEV EN DIFERENTES VECTORES DE EXPRESIÓN

Oligonucleótido <sup>(a)</sup>	Secuencia 5' – 3' <sup>(b)</sup>	Posición <sup>(c)</sup>
<b>RdRp1VS</b>	<i>GCACTCCAAGGCGCCAGTTT</i> ACTGTTGATCAAAGTTA (C)TT(G)AA(T)CGAGTGCG(C)GG(A)TC(A)AGTGCAGCT CGACTAGAACC	12309-12372
<b>RdRp1RS</b>	<i>GGCTGGGTCGACTATT</i> ATTGCAAGACAGTGGACTTTT CATAGAGGC	15067-15094
<b>RdRp2VS</b>	<i>GTATTTTCAGGGCGCCAGTTT</i> ACTG	12309-12318
<b>RdRp2RS</b>	CACACAACCTCCA(G)CA(G)CAGATAAAATCATCATAGA AAAG	14554-14592
<b>RdRp3VS</b>	GATTTTATCTG(C)TG(C)TGGAGTTGTGTGCTACAACA AAG	14566-14603
<b>RdRp3RS</b>	<i>GAGCTCGTCGACTATT</i> ATTGCAAGAC	15086-15094
<b>RdRp4VS</b>	<i>GCACGGGATCCATG</i> AGTTTACTGTTGATCAAAGTTA CTTG	12309-12335
<b>RdRp4RS</b>	<i>GGCTGGCTCGAGGCT</i> TGCAAGACAGTGGACTTTTC	15074-15094
<b>RdRp-F1VS</b>	<i>GCACGCTCGAGATG</i> AGTTTACTGTTGATCAAAGTTA CTTG	12309-12336
<b>RdRp-F1RS</b>	<i>GGCTGGGGATCCTATTA</i> ATAATCAGAACCATAGATGT CAC	13073-13096
<b>RdRp-F2VS</b>	<i>GCACGCTCGAGATG</i> GATCTTAATGGCAATTTCTACGA TTTCGG	12928-12957
<b>RdRp-F2RS</b>	<i>GGCTGGGGATCCTATTA</i> AGATCCCTCTTCAAAGAATC CACGC	13575-13600
<b>RdRp-F3VS</b>	<i>GCACGCTCGAGATG</i> CCAGGTCACTTAAACAAGGATTT CTACG	13534-13562
<b>RdRp-F3RS</b>	<i>GGCTGGGGATCCTATTA</i> ATTATGTGTACAACAACCAA CATGC	14223-14248
<b>RdRp-F4VS</b>	<i>GCACGCTCGAGATG</i> GATAATGGTTGTTTGATGGGATG GG	14125-14150
<b>RdRp-F4RS</b>	<i>GGCTGGGGATCCTATT</i> ATTGCAAGACAGTGGACTTTT CATAGAGGC	15068-15097
<b>RdRp5VS</b>	<i>GCACGCCCCGGGTAG</i> TTTTACTGTTGATCAAAGTTACTT G	12309-12345
<b>M13F</b>	GTTTTCCAGTCACGAC	(d)
<b>M13R</b>	CAGGAAACAGCTATGAC	(d)

(a) Vs, sentido viral o polaridad positiva; RS, sentido antiviral o polaridad negativa.

(b) Las bases subrayadas indican dianas de restricción. Los codones de iniciación (ATG) y de terminación (CTA o TTA) de la traducción se indican en negrita. Las secuencias en cursiva se añadieron para facilitar la restricción del fragmento amplificado. Las bases entre paréntesis indican los nucleótidos mutados. Las bases subrayadas y en negrita indican los nucleótidos añadidos.

(c) Posición en el genoma del TGEV. En los oligonucleótidos de sentido inverso se indica la posición de la secuencia complementaria.

(d) Oligonucleótidos que hibridan por delante del sitio de transposición Tn7R (M13F) y por detrás del sitio Tn7L (M13R).

## 5.6. Construcción de los moldes para la transcripción *in vitro* de los extremos del genoma

Para generar un molde de DNA para la transcripción *in vitro* del extremo 5' del genoma, se generó un fragmento de DNA, que contenía los primeros 504 nt del genoma viral bajo el control del promotor del fago SP6, mediante PCR utilizando como molde

el plásmido pM33L-637G (Galan y col., 2005) y los oligonucleótidos Xma I-SP6p-G-5'TGEV-VS, que incluye el promotor del fago SP6, y el 5'TGEV-504-RS (Tabla V). El amplicón resultante, PCR-5'TGEV, se purificó con el *Qiaquick PCR purification kit* (Qiagen), se resuspendió en 10 mM Tris-HCl pH 7.5 y se congeló a -70°C hasta su uso como molde en la reacción de transcripción *in vitro*.

Para la generación del RNA del extremo 3' del genoma del TGEV, los últimos 493 nt del genoma viral se amplificaron a partir del plásmido pM33L-637G (Galan y col., 2005) utilizando los oligonucleótidos Xma I-T7-GGG-ORF7-VS, que introduce el promotor del fago T7 precediendo la secuencia viral, y Hind III-poliA-RS (Tabla V), que incluye el poliA de 25 nt y el sitio Hind III. El producto de PCR se digirió con Xma I y Hind III y se clonó en el plásmido pM33L-637G digerido con estas mismas enzimas, generando el plásmido pM33L-3'-TGEV. El plásmido resultante se linearizó con Hind III, se trató con la nucleasa *MungBean* para eliminar los 3 nt 5'-protuberantes adicionales a la secuencia de poliA, se precipitó con AcNa y etanol, se resuspendió en 10 mM Tris-HCl pH 7.5 y se congeló a -70°C hasta su uso como molde en la reacción de transcripción *in vitro*.

**TABLA V. OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS PARA LA GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS QUE CONTIENEN LOS EXTREMOS 5' Y 3' DEL GENOMA DEL TGEV**

Oligonucleótido <sup>(a)</sup>	Secuencia 5' – 3' <sup>(b)</sup>	Posición <sup>(c)</sup>
XmaI-SP6p-G-5'TGEV-VS	<i>CGCGCCCCGGG</i> (ATTTAGGTGACACTATAG)ACTTTT AAAGTAAAGTGAGTGTAGC	1-25
5'TGEV-504-RS	CACCAATGACGTAGTGATCCTTACG	480-504
Xma I-T7-GGG-ORF7-VS	<i>CGCGCCCCGGG</i> (TAATACGACTCACTATAGGG)ATG CTGTATTTATTACAGTTTAAATC	28087-28112
Hind III-poliA-RS	<i>GCGCAAGCTT</i> AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AGTATCACTATC	28570-28580

(a) Vs, sentido viral o polaridad positiva; RS, sentido antiviral o polaridad negativa.

(b) Las bases subrayadas indican dianas de restricción. Los promotores de transcripción SP6p y T7p están entre paréntesis, el nucleótido de inicio de la transcripción se muestra en negrita. Las secuencias en cursiva se añadieron para facilitar la restricción del fragmento amplificado

(c) Posición en el genoma del TGEV. En los oligonucleótidos de sentido inverso se indica la posición de la secuencia complementaria.

## 6. GENERACIÓN DE BACULOVIRUS RECOMBINANTES

Los baculovirus recombinantes rBV-His-RdRp y rBV-His-RdRpDDAA, que expresan la RdRp del TGEV nativa y mutada en su centro catalítico, respectivamente, se generaron utilizando el sistema *Bac-to-Bac* (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del proveedor. Para ello, bacterias DH10Bac competentes se transformaron con los plásmidos pFBHT-RdRp y pFBHT-RdRpDDAA (ver apartado 3.3 de esta sección) para generar los bácmidos recombinantes mediante la transposición del casete de expresión de los plásmidos recombinantes intermedios al bácmido contenido en las células DH10Bac. Las colonias positivas se seleccionaron por color y se analizaron mediante PCR utilizando los oligonucleótidos M13F y M13R (Tabla IV), situados a ambos lados de la secuencia de transposición, y la enzima *Expand High Fidelity* (Roche). Finalmente los bácmidos recombinantes se purificaron utilizando el reactivo *Large Construct Kit* (Quiagen) y se transfectaron en células H5 con *Cellfectin* (Invitrogen) como se describe en el apartado 4.6 de esta sección. Cuando el efecto citopático fue del 60-80%, se recogió el sobrenadante y se clarificó por centrifugación a 1000g durante 10 min a 4°C. A partir de este clarificado se generaron *stocks* de los baculovirus recombinantes, los cuales se titularon como recomienda el proveedor (Invitrogen) (Seybert y col., 2000a).

## 7. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL RNA

### 7.1. Extracción y purificación del RNA intracelular

El RNA intracelular total se extrajo utilizando el reactivo *Rneasy Kit* (Quiagen) según las especificaciones del fabricante y se trató con DNasa I libre de RNAsas (Roche) para eliminar la posible contaminación con DNA, según lo descrito previamente (Huang y col., 1996). El RNA purificado se cuantificó espectrofotométricamente utilizando un espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000* (Nanodrop Technologies) y se guardó a -70°C hasta su utilización.

### 7.2. Análisis del RNA mediante RT-PCR

La síntesis del cDNA o retrotranscripción (RT) se realizó a partir de 200-700 ng de RNA intracelular total utilizando la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina (M-MLV) (Ambion), siguiendo las indicaciones del proveedor. En general, el RNA se calentó a 70°C durante 5 min y se incubó durante 1 h a 42°C con la mezcla de reacción, que contenía el tampón de síntesis de cDNA, 0.05 mM de una mezcla de dNTPs, 0.5 U/μl del inhibidor de RNAsas *Rnasin* (Promega), 10 pmoles del

oligonucleótido específico complementario a la secuencia a amplificar (Tabla VI) y 5 U de la enzima M-MLV. Una fracción del cDNA generado (1/10 del volumen de reacción) se utilizó como molde para su amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos específicos (Tabla VI) y las enzimas *AmpliTaq DNA polymerase* (Applied Biosystems) para fines analíticos y la *Platinum Pfx DNA polymerase* (Invitrogen) para fines preparativos, como se describe en el apartado 4.5 de esta sección. Finalmente los productos de RT-PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

**TABLA VI. OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS DEL RNA POR RT-PCR**

Oligonucleótido <sup>(a)</sup>	Secuencia 5' – 3'	Posición <sup>(b)</sup>	Amplión <sup>(c)</sup>
<b>URB-29VS</b>	GCCAACCAACCTCGATCTCTTG	29-50	mRNA N
<b>URB-28630RS</b>	TGCTTCCCTCTGCGTAGAAGCC	28630-28651	mRNA N
<b>URB-1931VS</b>	ACCACTCAATTCCTGATTGCA	1931-1952	gRNA
<b>URB-1995RS</b>	ATGGCGTCGACAAGACGTAAT	1995-2015	gRNA

(a) Vs, sentido viral o polaridad positiva; RS, sentido antiviral o polaridad negativa.

(b) Posición en el genoma del aislado Urbani del SARS-CoV. En los oligonucleótidos de sentido antiviral se indica la posición de la secuencia complementaria.

(c) Indica el RNA amplificado. gRNA, RNA genómico.

### 7.3. Cuantificación del RNA mediante RT-PCR a tiempo real (Q-RT-PCR)

La reacción de RT se realizó a partir de 50-200 ng de RNA total utilizando oligonucleótidos específicos complementarios a la secuencia a amplificar (Tabla VII) y la transcriptasa termoestable *Reflectase RT* (Active Motif) o el *High Capacity cDNA Transcription kit* (Applied Biosystems), siguiendo las indicaciones del fabricante. En cada caso, los cDNAs resultantes se analizaron mediante PCR cuantitativa utilizando oligonucleótidos específicos (Tabla VII) diseñados con el programa *Primer Express v2.0* (Applied Biosystems) y el reactivo *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) o con ensayos TaqMan (Applied Biosystems) específicos para cada RNA analizado (Tabla VII), siguiendo las especificaciones del fabricante. En ambos casos, la PCR cuantitativa se realizó en un equipo *ABI PRISM 7000* (Applied Biosystems) utilizando los parámetros universales de termociclación (95°C-10 min, 40 ciclos de 95°C-15 seg, 60°C-1 min). En el caso de usar el reactivo *SYBR Green PCR Master Mix*, se añadió un paso de desnaturalización incrementando la temperatura desde 60°C (T<sub>m</sub> de los oligonucleótidos) hasta 95°C, con el fin de analizar la curva de disociación del

producto amplificado. Los datos se analizaron utilizando el programa *ABI PRISM 7000 SDS v1.0* (Applied Biosystems). En todos los casos, se analizaron 2 experimentos independientes por triplicado. Los valores correspondientes a las medias de los valores de los ciclos de corte se usaron para calcular las cantidades relativas utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

**TABLA VII. OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS DEL RNA POR Q-RT-PCR**

Oligonucleótido <sup>(a)</sup>	Método	Secuencia 5' – 3' <sup>(b)</sup>	Posición <sup>(c)</sup>	Amplificación <sup>(d)</sup>
<b>URB-27VS</b>	<i>SYBR Green</i>	AAGCCAACCAACCTCGATCTC	27-57	mRNA N
<b>URB-28163RS</b>	<i>SYBR Green</i>	TGGGTCCACCAAATGTAATGC	28163-28183	mRNA N
<b>URB-1931VS</b>	<i>SYBR Green</i>	ACCACTCAATTCCTGATTTGCA	1931-1952	gRNA
<b>URB-2015RS</b>	<i>SYBR Green</i>	ATGGCGTCGACAAGACGTAAT	2015-35	gRNA
<b>TGEV-25-VS</b>	<i>TaqMan</i>	CGTGGCTATATCTCTCTTTTAC TTTAACTAG	25-56	mRNA 7
<b>TGEV-479-RS</b>	<i>TaqMan</i>	AAAACCTGTAATAAATACAGCAT GGAGGAA	479-507	mRNA 7
<b>TGEV mRNA 7</b>	<i>TaqMan</i>	FAM-CGAATCAAACGAGATGCT- MGB		mRNA 7
<b>hnRNP Q</b>	<i>TaqMan</i>	Hs00749309_s1		hnRNP Q
<b>EPRS</b>	<i>TaqMan</i>	Hs00270083_m1		EPRS
<b>PABP</b>	<i>TaqMan</i>	Hs00743792_s1		PABP
<b>GAPDH</b>	<i>TaqMan</i>	Hs99999905_m1		GAPDH

(a) Vs, sentido viral o polaridad positiva; RS, sentido antiviral o polaridad negativa.

(b) En el caso de los genes celulares Proteína heterogénea nuclear Q (hnRNP Q), Glutamil-prolil tRNA-sintetasa (EPRS), PABP y Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se indica el número de referencia del ensayo TaqMan comercial utilizado (Applied Biosystems).

(c) Posición en el genoma del aislado Urbani del SARS-CoV o del TGEV. En los oligonucleótidos de sentido antiviral se indica la posición de la secuencia complementaria.

(d) Indica el RNA amplificado. gRNA, RNA genómico.

## 8. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

### 8.1. Electroforesis de proteínas

La electroforesis de proteínas se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida según lo descrito previamente (Laemmli, 1970). En general, las muestras se resuspendieron en tampón de disociación Laemmli (60 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 0.1 M DTT, 10% glicerol), se resolvieron mediante SDS-PAGE en geles continuos de poliacrilamida al 10% y se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie utilizando los reactivos *EZBlue Gel Staining Reagent* (Sigma) o *Simple Blue SafeStain* (Invitrogen), o con nitrato de plata utilizando el reactivo *ProteoSilver Plus Silver Stain* (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante en cada caso.

Para el análisis de la RdRp u otras proteínas de la replicasa viral en extractos de células infectadas y la separación de proteínas que posteriormente serían analizadas mediante espectrometría de masas, se utilizaron geles comerciales en gradiente *NuPAGE 4-12% Bis-Tris* y *NuPAGE MOPS SDS Running buffer* (Invitrogen) como solución electrolito, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

## 8.2. Inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA)

La evaluación de la reactividad de los Acms frente a la RdRp se realizó mediante ELISA. Para ello, placas de ELISA de 96 pocillos *Maxisorp* (Nunc) se tapizaron con 200 ng/pocillo de RdRp purificada durante 12 h a 4°C, se bloquearon con BSA al 3% en PBS durante 1 h a 37°C y se incubaron con diversas diluciones de los sobrenadantes analizados en solución de lavado (0.1% BSA, 0.05% Tween-20 en PBS) durante 90 min a 37°C. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado a peroxidasa (Sigma) diluido 1:4000 en solución de lavado durante 1 h a 37°C y los anticuerpos unidos se detectaron con el reactivo *K-Blue® MAX TMB Substrate* (NeoGen) mediante absorción a 450 nm en un lector *Microplate Reader 680* (BioRad) y el programa *Microplate Manager 5.2.1*. El título de un anticuerpo se definió como el inverso de la dilución en la que se obtenía el triple de absorbancia que con el control negativo usando BSA como antígeno.

## 8.3. Transferencia electroforética de proteínas a membranas de nitrocelulosa e inmunodetección (*Western blot*)

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Hybond-C Extra nitrocellulose membrana*, GE Healthcare) durante 50 min a 100 V en tampón de transferencia (25 mM Tris-HCL pH 8.8, 192 mM glicina, 20% metanol), utilizando un sistema de electrotransferencia *MINI-PROTEAN II* ó *III* (Bio-Rad), siguiendo las condiciones recomendadas por la casa comercial. Una vez trasferidas las proteínas, las membranas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con leche en polvo al 3% en TTBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) y se incubaron con los anticuerpos específicos (Tabla VIII) diluidos en TTBS con leche en polvo al 1% durante 1h a temperatura ambiente o durante 12 h a 4°C. Posteriormente, las membranas se lavaron con TTBS y se incubaron con el anticuerpo secundario, cabra anti-ratón o anti-conejo acoplado a peroxidasa, (Sigma) (Tabla VIII) diluido en TTBS con leche en polvo al 1% durante 1h a



temperatura ambiente. Finalmente, después de lavar exhaustivamente las membranas con TTBS, los anticuerpos unidos se detectaron utilizando el reactivo *Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate* (Milipore), siguiendo las indicaciones del proveedor.

#### 8.4. Inmunomicroscopía de fluorescencia

Células H5 o ST crecidas sobre cubreobjetos estériles en placas de cultivos de 24 pocillos a una confluencia del 80%, se infectaron a una mdi de 2 ó 5 UFP/célula con los virus rBV-His-RdRp o TGEV PUR46-MAD, respectivamente. A diferentes hdi, las células se lavaron 3 veces con PBS, se fijaron mediante incubación con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.1% durante 15 min a temperatura ambiente. Alternativamente, las células se fijaron y permeabilizaron mediante incubación con metanol durante 10 min a -20°C. Para su análisis mediante inmunofluorescencia indirecta, las células se lavaron 3 veces con PBS, se incubaron con solución de bloqueo (10% SFT en PBS) durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente, con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla VIII) diluido en solución de bloqueo durante 90 min a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavaron 3 veces con PBS, se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes (Tabla VIII) conjugados a los fluorocromos *Alexa Fluor* 488 ó 594 (Invitrogen) diluidos en solución de bloqueo y después de 6 lavados con PBS, los núcleos se tiñeron mediante incubación con 1 mg/ml de diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma) durante 20 min a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se montaron sobre portaobjetos utilizando el reactivo *Prolong Gold anti-fade reagent* (Invitrogen) y se examinaron con un microscopio de fluorescencia *ZEISS Axiophot* (ZEISS) o con un microscopio confocal *Leica SP5 laser scanning microscope* (Leica). En todos los casos, las imágenes se tomaron y procesaron con los programas *LAS AF* (Leica) y *Adobe Photoshop CS3/CS4* (Adobe).

Para el análisis por inmunofluorescencia de viriones purificados del TGEV, las partículas virales se adsorbieron a cubreobjetos previamente tratados con 0.1 mg/ml de poli-L-Lisina (Sigma), se fijaron con PFA al 4% en PBS durante 45 min a temperatura ambiente y en los casos indicados, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.5% durante 20 min a temperatura ambiente. Los viriones fijados y permeabilizados fueron incubados con los anticuerpos primarios y secundarios correspondientes (Tabla VIII),

como se ha descrito para las células infectadas. Finalmente, las muestras se examinaron con un microscopio confocal *Leica SP5 laser scanning microscope* (Leica), se tomaron imágenes y estas se procesaron utilizando los programas *LAS AF* (Leica) y *Adobe Photoshop CS3/CS4* (Adobe).

## **8.5. Microscopía electrónica**

### **8.5.1. Tinción negativa de viriones purificados del TGEV**

La tinción negativa se realizó mediante técnicas estándar descritas previamente (Bremer y col., 1998). Las muestras se adsorbieron durante 2 min a rejillas de cobre activadas por ionización (7 mA durante 15 seg), se lavaron tres veces con agua desionizada, se tiñeron con acetato de uranilo al 2% durante 30 seg y se examinaron en un microscopio electrónico *JEOL 1200 EX II* (Tokio, Japón). Las imágenes se adquirieron utilizando una cámara CCD y el sistema *SIS Megaview III* (Olympus).

### **8.5.2. Procesamiento de muestras para estudios ultraestructurales**

Monocapas de células ST no infectadas o infectadas con TGEV PUR46-MAD a una mdi de 5 UFP/célula, se fijaron *in situ* a las 5 y 12 hdi con una mezcla de 4% PFA y 2% glutaraldehído en tampón fosfato Na/K (pH 7.4) durante 90 min a temperatura ambiente. Las monocapas fijadas se lavaron 3 veces con tampón fosfato Na/K (pH 7.4), se transfirieron a tubos *Eppendorf*, se centrifugaron en una microcentrífuga y se procesaron para su inclusión en la resina *epoxy TAAB 812* (TAAB Laboratories), siguiendo procedimientos estándar (DeDiego y col., 2007). Las células se trataron con una mezcla de tetróxido de osmio al 1% y ferricianuro potásico al 0.8% en agua desionizada durante 1 h a 4°C, se lavaron 3 veces con agua desionizada, se trataron con ácido tánico al 0.15% durante 1 min y con acetato de uranilo al 2% durante 1 h a 4°C, se lavaron 3 veces y se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol (50, 75, 90, 95 y 3 x 100%) durante 10 min a 4°C. Posteriormente, la resina se infiltró en las muestras mediante incubación con concentraciones crecientes de la resina en etanol (33, 50, 66 y 100%) y se polimerizó a 60°C durante 2 días. A partir de las muestras incluidas, se obtuvieron secciones ultrafinas (90 nm) con una cuchilla de diamante utilizando un ultramicrotomo *LEICA ULTRACUT UCT* (Leica). Finalmente, las secciones se tiñeron con acetato de uranilo al 2% durante 7 min y con citrato de plomo al 0.3% durante 2 min y se examinaron en un microscopio electrónico *JEOL 1200 EX II*

(Tokio, Japón). Las imágenes se adquirieron utilizando una cámara CCD y el sistema *SIS Megaview III* (Olympus).

### 8.5.3. Procesamiento de muestras para inmunomicroscopía electrónica

El procesamiento de las muestras para su análisis mediante inmunomicroscopía electrónica se realizó mediante vitrificación y criosustitución siguiendo procedimientos estándar previamente descritos (Ortego y col., 2007). Células ST no infectadas o infectadas con TGEV PUR46-MAD a una mdi de 5 UFP/célula, fueron prefijadas con una mezcla de 4% PFA y 0.1 % glutaraldehído en tampón fosfato Na/K (pH 7.4) durante 2 h a temperatura ambiente, se incluyeron en gelatina al 10% en PBS y se crioprotegieron mediante la incubación con un volumen de glicerol al 30% en PBS durante 15 min a 4°C. En el caso de las partículas virales, estas se prefijaron durante 30 min a 4°C, se incluyeron en gelatina al 4% con glutaraldehído al 0.1% en PBS y se crioprotegieron con glicerol al 30% en PBS durante 4 h a 4°C. Posteriormente, se realizó el proceso de vitrificación mediante la inmersión de las muestras en etano líquido a -180°C, utilizando el equipo de criofijación por inmersión *KF80* de Leica. Las muestras vitrificadas se transfirieron a una unidad de criosustitución *AFS EM FSP* (Leica), donde se llevó a cabo el proceso de criosustitución en metanol anhidro y 0.5% de acetato de uranilo durante 54 h a -85°C. A continuación, las muestras se infiltraron con la resina acrílica *Lowicryl HM20* (TAAB Laboratories) a -45°C sustituyendo el medio de criosustitución por concentraciones crecientes de resina en metanol (33, 50, 66 y 100 %). Finalmente, las muestras infiltradas se polimerizaron con luz UV durante 38 h a -45°C y se incremento gradualmente la temperatura de forma controlada hasta temperatura ambiente. A partir de las muestras incluidas, se obtuvieron secciones ultrafinas (90 nm) en un ultramicrotomo *LEICA ULTRACUT UCT* (Leica), las cuales fueron procesadas para inmunomarcaje con partículas de oro. Para ello, las secciones recogidas en rejillas de oro se bloquearon durante 30 min con tampón TBG (30 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl, 1% gelatina, 0.1% BSA) y se incubaron mediante flotación sobre gotas del anticuerpo primario (Tabla VIII) diluido en TBG durante 90 min a temperatura ambiente. Después de 3 lavados de 10 min con TBS (30 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl), las muestras se volvieron a bloquear con TBG durante 15 min a temperatura ambiente y se incubaron durante 45 min a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios adecuados conjugados a partículas de oro de 5 nm de diámetro (BBI) diluidos en TBG (Tabla VIII). Finalmente, las muestras se lavaron con

TBS y agua bidestilada, se secaron sobre papel de filtro, se tiñeron con acetato de uranilo al 2% durante 20 min a temperatura ambiente y se examinaron con un microscopio electrónico *JEOL 1200 EX II* (Tokio, Japón). Las imágenes se tomaron utilizando una cámara CCD y el sistema *SIS Megaview III* (Olympus).

## **8.6. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas**

### **8.6.1. Preparación de muestras**

Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE utilizando geles comerciales *NuPAGE 4-12% Bis-Tris* (Invitrogen). En la cubeta superior se añadió 0.5 ml de antioxidante NuPAGE (Invitrogen) para evitar que las proteínas previamente reducidas por el DTT se oxidaran durante la electroforesis. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se lavó tres veces durante 5 min con 100 ml de agua bidestilada, se tiñó con azul de Coomassie *Simple Blue Safe Stain* (Invitrogen) según las indicaciones del proveedor y se tomaron imágenes utilizando un scanner *UMAX Astra 4000U*. Las bandas de proteína se recortaron del gel con un bisturí tomando el mínimo volumen de gel y se digirieron con tripsina, utilizando la estación de digestión automática *Proteineer DP* (Bruker Daltonics), siguiendo las indicaciones del fabricante (Houthaeve y col., 1995). La extracción de los péptidos tripticos para su análisis mediante espectrometría de masas se realizó con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.5% durante 15 min. Posteriormente, la muestra se secó con calor en una centrífuga de vacío *SpeedVac* y se reconstituyó con 4 µl de 30% acetonitrilo, 15% isopropanol y 0.1% TFA.

### **8.6.2. Espectrometría de masas de desorción/ionización por laser asistida por matriz y acoplada a un detector de tiempo de vuelo (MALDI-TOF/TOF)**

Para la obtención de las masas de los péptidos tripticos, 0.8 µl de la mezcla de péptidos se depositaron en un portamuestras *386-well OptiTOF* (Applied Biosystems) y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 0.8 µl de solución matriz (0.3% ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinámico, 30% acetonitrilo, 15% isopropanol y 0.1% TFA) y se dejó secar de nuevo a temperatura ambiente. Una vez cocrystalizado el analito con la solución matriz, las muestras fueron analizadas de manera automática en un espectrómetro de masas 4800 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems) en modo reflector positivo de iones utilizando un voltaje de aceleración de iones de 25 kV para la adquisición de los espectros de MS y de 1 kV para los de MS/MS.

### 8.6.3. Identificación de proteínas en las bases de datos

Las masas correspondientes a los péptidos trípticos registradas se enviaron automáticamente a través del programa *Global Protein Server* (GPS, Applied Biosystems) o desde el sitio web <http://www.matrixscience.com>, al programa *Mascot* v2.1 (Matrix Science, London, UK) para efectuar la búsqueda en las bases de datos del NCBI. En los casos pertinentes se introdujeron restricciones de taxonomía para la búsqueda de candidatos, seleccionando la base de datos de mamíferos, humanos o virus. En el caso del análisis de proteínas de la partícula viral, se utilizó una base de datos adicional generada en el laboratorio que contenía las proteínas estructurales y no estructurales del TGEV. En todos los casos, se tuvo en cuenta como modificación fija la carbamidometilación de las cisteínas y como modificación variable la oxidación de las metioninas. La masa molecular para la búsqueda de proteínas candidato no se restringió a ningún valor y los valores de las masas de los péptidos trípticos seleccionados fueron las correspondientes a especies monoisotópicas y monoprotonadas. Se permitió la ausencia de un corte por la tripsina y la tolerancia se fijó en 0.1 Da. Finalmente, para cada identificación se comprobó que la masa molecular de la proteína asignada correspondiera a la estimada por movilidad electroforética de la proteína recortada del gel.

## 8.7. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

### 8.7.1. Expresión de la RdRp del TGEV en baculovirus y purificación mediante cromatografía de afinidad metálica

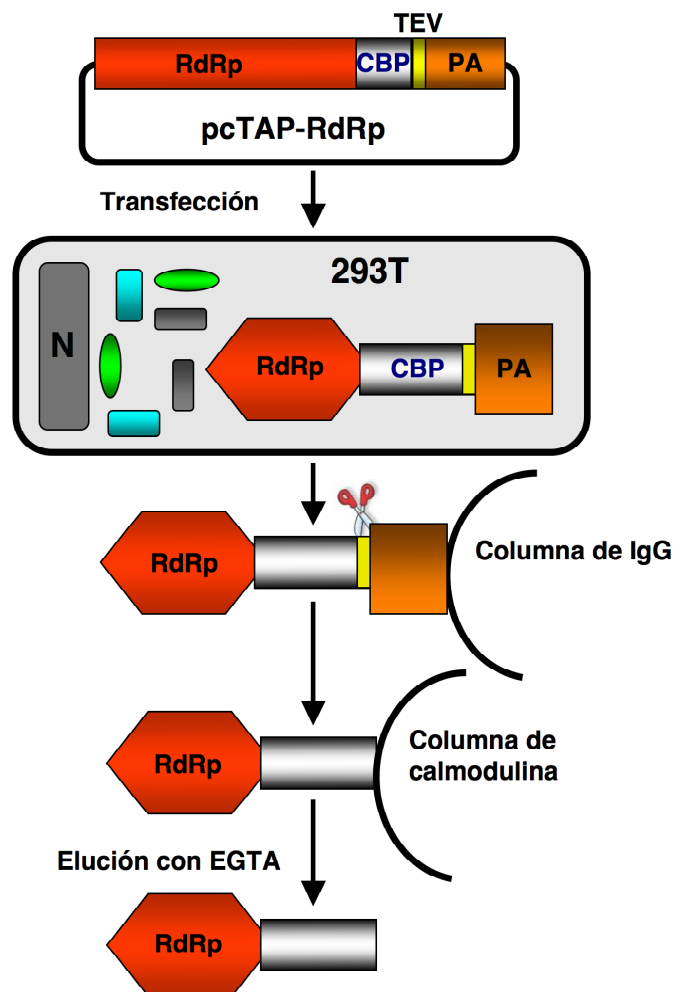
Una vez generados los baculovirus recombinantes que expresaban la RdRp y la RdRpDDAA, fusionadas a una cola de 6xHis en su extremo N-terminal (His-RdRp y His-RdRpDDAA, respectivamente), se analizó y optimizó su expresión en células H5. Para ello, se infectaron células al 90% de confluencia con los baculovirus recombinantes a diferentes mdi y se analizó la expresión de las proteínas recombinantes a diferentes hdi mediante SDS-PAGE y *Western blot* utilizando un anticuerpo comercial anti-histidinas conjugado a peroxidasa (Sigma) (Tabla VIII). Los mayores niveles de expresión se obtuvieron infectando a una mdi de 2 UFP/célula durante 60 h. Utilizando las condiciones optimizadas, se procedió a la expresión a gran escala de la proteína recombinante y a su purificación en condiciones nativas mediante cromatografía de afinidad metálica (IMAC) utilizando una resina de níquel (Sigma), siguiendo las indicaciones del proveedor con ligeras modificaciones. Células H5 al 90% de

confluencia se infectaron con los baculovirus recombinantes a mdi de 2 UFP/célula. A las 60 hdi se recogieron las células, se lavaron 2 veces con PBS y se resuspendieron en 1 ml de solución de unión (50 mM fosfato sódico pH 8, 300 mM NaCl, 4.5 mM imidazol e inhibidores de proteasas) por cada  $1.5 \times 10^7$  células. Posteriormente,  $7.5 \times 10^7$  células (5 ml) se lisaron mediante 3 ciclos de congelación/descongelación, el DNA genómico se fragmento pasando el extracto 6 veces a través de una aguja de 18-G y el material celular insoluble se eliminó mediante centrifugación a 5000g durante 15 min a 4°C. La proteína recombinante presente en el sobrenadante se incubó con 1.4 ml de la resina (*Ni-NTA agarose*, Sigma) durante 2 h a 4°C en un agitador orbital. Posteriormente, la resina se lavó 3 veces con 7 ml de la solución de unión y 2 veces con 5 ml de la solución de lavado 1 (50 mM fosfato sódico pH 8, 300 mM NaCl, 9 mM imidazol) durante 10 min por lavado a 4°C. A continuación, la resina con la proteína recombinante unida se depositó en una columna de 10 ml y se lavó a 4°C con 5 ml de la solución de lavado 2 (50 mM fosfato sódico pH 8, 300 mM NaCl, 15 mM imidazol) a un flujo constante de 150 µl/min. Finalmente, la proteína recombinante se eluyó con 3 ml de solución de elución (50 mM fosfato sódico pH 8, 300 mM NaCl, 150 mM imidazol) a un flujo constante de 50 µl/min. Durante la elución se recogieron fracciones de 0.5 ml que se analizaron mediante SDS-PAGE. Las fracciones con mayor concentración de proteína se juntaron y se eliminaron las sales utilizando columnas de Sephadex G-25 (*PD-10 Desalting columns*, GE Healthcare) y la solución PE (50 mM fosfato sódico pH 8, 100 mM NaCl). La proteína purificada se analizó mediante SDS-PAGE, se cuantificó con el reactivo *BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit* (Pierce), se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C hasta su uso.

### 8.7.2. Expresión y purificación de la RdRp fusionada al dominio TAP

La RdRp fusionada al dominio TAP se expresó en células 293T y se purificó en condiciones nativas mediante la tecnología del TAP (Puig y col., 2001), que consiste en una cromatografía doble de afinidad a IgG y calmodulina (Fig. 11). Células 293T crecidas en placas de 100-mm de diámetro se transfectaron con el plásmido pcTAP-RdRp utilizando fosfato cálcico o *Lipofectamina 2000* (Invitrogen), siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.6 de esta sección. A las 48 horas después de la transfección (hdt) las células procedentes de una placa de 100-mm de diámetro se levantaron con una espátula, se lavaron 2 veces con PBS y se lisaron a 4°C durante 30 min con 250 µl de la solución de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM

EDTA, 0.5% Igepal, 1 mM DTT) suplementada con inhibidores de proteasas (Roche). Los lisados se centrifugaron a 3000g durante 3 min a 4°C para eliminar los núcleos, se recogió el sobrenadante y el material celular insoluble se eliminó mediante centrifugación a 10000g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante final, diluido 10 veces con la solución IPP (10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% Igepal), se incubó con 25 µl de resina de IgG (*IgG-sepharose*, GE Healthcare) durante 12 h a 4°C en un agitador orbital. Después de 10 lavados con la solución IPP y 5 lavados con la solución TEV (10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% Igepal, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT), la proteína recombinante unida a la resina se incubó con 3 U de la proteasa TEV



**Figura 11. Purificación de proteínas mediante la tecnología del TAP.** La proteína de interés se expresa bajo el control del promotor del CMV, fusionada en su extremo C-terminal con el dominio TAP, el cual está constituido por el péptido de unión a calmodulina (CBP), la secuencia de corte para la proteasa TEV y el dominio de unión a IgG de la proteína A (PA). Posteriormente, la proteína recombinante se purifica por una doble cromatografía de afinidad. En un primer paso la proteína se une a una resina de IgG y es eluida mediante el corte con la proteasa TEV. En un segundo paso la proteína se une a una resina de calmodulina mediante el péptido CBP y es eluida en condiciones nativas con EGTA.

(Invitrogen) durante 3 h a temperatura ambiente. La proteína liberada de la resina se diluyó 5 veces con la solución CBB (10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% Igepal, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 1 mM  $MgAc_2$ , 1 mM imidazol, 2 mM  $CaCl_2$ ) y se incubó a 4°C durante 12 h con 25  $\mu$ l de la resina de calmodulina (*calmodulin-agarose*, Stratagene). Finalmente, después de lavar 10 veces con la solución CBB, la proteína recombinante se eluyó con 70  $\mu$ l de la solución CEB (10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% Igepal, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 1 mM  $MgAc_2$ , 1 mM imidazol, 3 mM EGTA) y se analizó mediante SDS-PAGE y *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-CBP (Tabla VIII). La proteína recombinante purificada se congeló a -70°C hasta su uso.

## 9. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS

### 9.1. Generación de Acms frente a la RdRp del TGEV y mapeo epitópico

#### 9.1.1. Obtención de Acms

Los Acms de ratón específicos de la RdRp del TGEV (Tabla VIII) se generaron siguiendo procedimientos estándar (Harlow y Lane, 1988). Cinco ratones BALB/c de 8 semanas de edad se inmunizaron subcutáneamente con 30  $\mu$ g de la proteína purificada His-RdRp (producida en baculovirus) en adyuvante completo de *Freud* (Disco), seguido de inoculaciones similares del antígeno en adyuvante incompleto de *Freud* a intervalos de 4 semanas. Diez días después de la segunda inmunización en adyuvante incompleto de *Freud* (Disco), se extrajo suero de cada ratón y se analizó la respuesta anti RdRp mediante ELISA. El ratón cuyo suero dio una mayor respuesta específica frente al antígeno, se inoculó intraperitonealmente con 70  $\mu$ g del antígeno en PBS y 3 días después las células del bazo se fusionaron con la línea celular de mieloma murino P3X63-Ag8653 (CRL 1580, American Type Culture Collection) utilizando polietilenglicol 4000 (Merck), según lo descrito previamente (Galfre y Milstein, 1981; Kremer y Marquez, 2004). Los hibridomas resultantes se seleccionaron por su respuesta frente al antígeno mediante ELISA, *Western blot* e inmunofluorescencia, se estabilizaron mediante 2 pasos de clonaje y se amplificaron para obtener un lote de trabajo. El isotipo de los Acms generados se determinó mediante un ensayo de ELISA indirecto tipo sándwich utilizando anticuerpos de cabra conjugados a peroxidasa específicos frente a las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas de ratón IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgM (DAKO). Finalmente, los anticuerpos se purificaron mediante cromatografía de afinidad utilizando columnas de proteína G acoplada a sefarosa (*protein-G Sepharose*, Pharmacia), según las especificaciones del proveedor.



### 9.1.2. Identificación de los epítomos reconocidos por los Acms

Debido al enorme tamaño de la RdRp, la identificación de los epítomos reconocidos por los Acms específicos de la RdRp se realizó en 2 etapas. En una primera etapa, se identificó la región de la RdRp reconocida por los Acms utilizando los plásmidos pcDNA-F1, F2, F3 y F4 (ver apartado 5.3 de esta sección), los cuales expresaban 4 fragmentos solapantes de la RdRp de aproximadamente 250 aa. Los 4 fragmentos se expresaron *in vitro* a partir de 1 µg de cada plásmido utilizando el sistema de transcripción-traducción acoplada *TNT<sup>®</sup> coupled reticulocyte lysate system* (Promega), en presencia de lisina biotinilada (*Biotinylated Lys-tRNA*, Promega) con el fin de detectar las proteínas expresadas con estreptavidina conjugada a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology). Finalmente, la unión de los Acms a los diferentes fragmentos sintetizados *in vitro* se analizó mediante *Western blot*. Una vez definido el fragmento reconocido por los diferentes Acms, los epítomos específicos se identificaron en una segunda etapa mediante “Pepscan”. Para ello, una colección de péptidos de 10 aa, solapantes en 8 aa, que cubrían la secuencia del fragmento seleccionado, se generó por el método de *SPOT-synthesis* (Frank, 2002), utilizando un aparato ASP222 (Intavis AG). Los péptidos generados se unieron a una membrana de celulosa *Amino-PEG<sub>500</sub>-UC540* (Intavis AG) y se analizaron mediante *Western blot* utilizando los Acms específicos de la RdRp.

### 9.2. Generación de anticuerpos policlonales frente a las proteínas de la replicasa viral

Todos los anticuerpos policlonales (Acps) fueron generados en conejo por diferentes empresas biotecnológicas siguiendo procedimientos estándar.

El Acp frente a la RdRp (Tabla VIII) fue generado por la empresa *Biogenes* (Alemania) utilizando como antígeno la proteína purificada His-RdRp producida en baculovirus.

El Acp específico para la proteína nsp3 del TGEV (Tabla VIII) se generó por la empresa *Biomedal* (España) utilizando como inmunógeno un fragmento de 345 aa del extremo N-terminal (aa 879 al 1224 de la pplab) expresando en *E.coli*. La secuencia codificante del fragmento seleccionado se sintetizó *in vitro* por la empresa *Geneart* (Alemania) con optimización de codones para su expresión en bacterias. La expresión

TABLA VIII. ANTICUERPOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO

Anticuerpo <sup>(a)</sup>	Especie <sup>(b)</sup>	Procedencia <sup>(c)</sup>	Dilución de trabajo <sup>(d)</sup>		
			WB	IF	IME
Proteínas celulares					
Acp anti-GRP78	Conejo	Abcam	1:4000	ND	ND
Acp anti-EPRS	Conejo	Abcam	1:2500	ND	ND
Acp anti-hnRNP A1	Conejo	S. Cruz Biotech.	1:1000	ND	ND
Acp anti-hnRNP A2/B1	Conejo	S. Cruz Biotech.	1:200	ND	ND
Acp anti-hnRNP A0	Conejo	S. Cruz Biotech.	1:500	ND	ND
Acm anti-hnRNP Q	Ratón	S. Cruz Biotech.	1:200	ND	ND
Acp anti-hnRNP U	Conejo	S. Cruz Biotech.	1:1000	ND	ND
Acp anti-PTB	Cobaya	ATCC	1:1000	ND	ND
Acp anti-RRS	Conejo	Abcam	1:4000	ND	ND
Acp anti-P100	Cobaya	Progen Biotechnik	1:4000	ND	ND
Acp anti-GAPDH	Conejo	Abcam	1:7000	ND	1:25
Acp anti-PABP	Conejo	Dra. A. Nieto	1:2500	ND	1:20
Acp anti-Mov10	Conejo	Abcam	1:1500	1:300	1:100
Acm anti-actina	Ratón	Abcam	1:10000	ND	ND
Proteínas virales					
Acm anti-N (3DC10)	Ratón	Laboratorio	1:2000	1:300	1:10
Acm anti-S (5BH1)	Ratón	Laboratorio	1:2000	ND	ND
Acm anti-GP5 (3AH9)	Ratón	Laboratorio	ND	1:300	1:10
Acm anti-RdRp (4D10)	Ratón	Laboratorio	1:100	1:10	NF
Acm anti-RdRp (2C11)	Ratón	Laboratorio	1:100	1:10	NF
Acm anti-RdRp (2C11) Pur.	Ratón	Laboratorio	ND	ND	1:50
Acm anti-RdRp (3C12)	Ratón	Laboratorio	1:100	1:10	NF
Acm anti-RdRp (2B5)	Ratón	Laboratorio	1:100	1:10	NF
Acm anti-RdRp (5H1)	Ratón	Laboratorio	1:100	1:10	NF
Acm anti-RdRp (3F9)	Ratón	Laboratorio	1:100	1:10	NF
Acp anti-RdRp	Conejo	Laboratorio	1:100	1:10	NF
Acp anti-nsp3	Conejo	Laboratorio	1:8000	1:1500	1:50
Acp anti-TGEV	Conejo	Laboratorio	ND	1:1000	ND
Acp anti-nsp2	Conejo	Dr. J. Ziebuhr	1:2000	1:300	1:25
Acp anti-nsp5	Conejo	Dr. J. Ziebuhr	NF	1:300	NF
Acp anti-nsp8	Conejo	Dr. J. Ziebuhr	1:2000	1:300	NF
Otros					
Acm anti-histidinas	Ratón	Sigma	1:20000	1:1000	ND
Acp anti-CBP	Conejo	Upstate	1:3000	ND	ND
Acm anti-dsRNA	Ratón	Scientific Consulting	ND	1:200	ND
Anticuerpos secundarios					
Anti-IgG-peroxidasa	Cabra	Sigma	1:30000	-	-
Anti-IgG-alexa (488 ó 594)	Cabra	Invitrogen	-	1:500	-
Anti-IgG-oro (5 nm)	Cabra	BBI	-	-	1:40

(a) Acm, Anticuerpo monoclonal; Acp, Anticuerpo policlonal.

(b) Especie animal en la que se generó el anticuerpo.

(c) Casas comerciales o laboratorios de donde se obtuvieron los anticuerpos. Dra. Amelia Nieto, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, España. Dr. John Ziebuhr, Justus Liebig University, Giessen, Germany.

(d) Se indica la técnica en la que se utilizan los anticuerpos y la dilución de trabajo. WB, *Western blot*; IF, inmunofluorescencia; IME, inmunomicroscopía electrónica; NF, no funciona; ND, no determinado.

en *E.coli* de la proteína fusionada a una cola de 6xHis en el extremo C-terminal, utilizando el vector pALEX2HCa, y su posterior purificación mediante IMAC con una resina de níquel fue realizada por la empresa *Biomedal* (España).

Los Acps frente a las nsps 2, 5 y 8 (Tabla VIII) fueron cedidos por el Dr. John Ziebuhr (Justus Liebig University, Alemania). El Acp específico de la nsp2 se generó usando como inmunógeno la proteína del TGEV, mientras que los anticuerpos frente a las nsps 5 y 8 se generaron utilizando las proteínas del HCoV-229E, el cual está muy relacionado con el TGEV.

## **10. OBTENCIÓN DE VDMs INDUCIDAS POR EL TGEV**

Las VDMs inducidas por la infección del TGEV se purificaron parcialmente mediante fraccionamiento celular por centrifugación diferencial, siguiendo el procedimiento descrito para el arterivirus EAV y el SARS-CoV (van Hemert y col., 2008a; van Hemert y col., 2008b) con algunas modificaciones. Monocapas de células ST ( $2 \times 10^8$  células) no infectadas o infectadas con TGEV PUR46-MAD a una mdi de 5 UFP/célula, se recogieron a las 12 hdi, se lavaron 2 veces con PBS, se levantaron con una solución de tripsina/EDTA y se centrifugaron a 1500g durante 10 min a 4°C. Las células se resuspendieron en 2 ml de una solución hipotónica (20 mM HEPES pH 7.4, 10 mM KCl, 1.5 mM MgAc<sub>2</sub>, 1 mM DTT) suplementada con inhibidores de proteasas y se incubaron durante 15 min a 4°C. A continuación, las células se rompieron utilizando un homogenizador Dounce y las condiciones isotónicas se restauraron añadiendo 2 ml de una solución isotónica 2x (100 mM HEPES pH 7.4, 500 mM sacarosa, 12 mM KCl, 8 mM DTT, 1 mM MgAc<sub>2</sub>) suplementada con inhibidor de proteasas. Los núcleos se eliminaron mediante centrifugación a 1000g durante 10 min a 4°C y el sobrenadante resultante se fraccionó mediante centrifugación a 10000g durante 10 min a 4°C, generando una fracción soluble y una fracción insoluble. Finalmente, la fracción insoluble, que se corresponde con la fracción microsomal que incluye las VDMs, se resuspendió en 200 µl de PBS y se congeló a -70°C hasta su uso.

## 11. METODOLOGÍA UTILIZADA PARA EL AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON LOS EXTREMOS DEL GENOMA DEL TGEV

### 11.1. Transcripción *in vitro* y purificación de los extremos del genoma viral marcados con biotina

El RNA utilizado en la cromatografía de afinidad a RNA se sintetizó mediante transcripción *in vitro* a partir de 200 ng del amplicón PCR-5'TGEV (contiene los primeros 504 nt del genoma bajo el control del promotor del fago SP6) y de 1 µg del plásmido pM33L-3'TGEV (contiene los últimos 493 nt del genoma bajo el control del promotor del fago T7) linearizado con Hind III y tratado con la nucleasa *MungBean*, utilizando el reactivo *SP6/T7 Transcription kit* (Roche) según las instrucciones del fabricante. Para el marcaje del RNA se añadió a la reacción Biotina-14-CTP (GibcoBRL) en una relación 1:5.25 con respecto al CTP no marcado, quedando a una concentración final de 0.16 mM. Las reacciones se incubaron durante 2 h a 37°C y a continuación se trataron con 10 U de DNasa I durante 30 min para eliminar el DNA molde. Finalmente, los transcritos resultantes se purificaron utilizando el reactivo *RNeasy kit* de QIAGEN, se analizaron en geles desnaturalizantes de 1% agarosa-2.2 M formaldehído, se cuantificaron espectrofotométricamente y se almacenaron en alícuotas a -70°C.

### 11.2. Preparación de extractos de proteínas citoplasmáticas

Los extractos de proteínas citoplasmáticas se prepararon a partir de monocapas confluentes de células ST y BHK-pAPN infectadas con el aislado PUR46-MAD del TGEV a una mdi de 10 UFP/célula durante 7 h o a partir de células humanas Huh-7 infectadas con el aislado PUR46-C11 del TGEV a una mdi de 5 UFP/célula durante 36 h. A los tiempos indicados después de la infección, las células se lavaron 2 veces con 25 ml de PBS a 4°C, se desprendieron con una espátula, se centrifugaron a 500g durante 10 min a 4°C, se resuspendieron en PBS a una concentración estimada de  $4 \times 10^7$  células/ml y se congelaron a -70°C hasta su procesamiento. Para la generación de extractos de proteínas citoplasmáticas,  $4 \times 10^7$  células congeladas en PBS se centrifugaron a 500g durante 10 min a 4°C, se resuspendieron en 400 µl de tampón de extracción (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT y cóctel de inhibidores de proteasas *Complete* de Roche) y se lisaron a 4°C durante 15 min. A continuación, se añadieron 25 µl de Igepal al 10% y después de agitar en vortex 10 seg,

los núcleos se eliminaron por centrifugación a 13000g durante 30 seg. Finalmente, se añadió glicerol al sobrenadante hasta una concentración final del 10%, se determinó la concentración de proteínas con el reactivo *BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit* (Pierce) y se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **11.3. Cromatografía de afinidad de RNA**

La cromatografía de afinidad se realizó en tubos de PCR utilizando como matriz *Streptavidin Sepharose High Performance* (Amersham). Todas las incubaciones se realizaron a  $4^{\circ}\text{C}$  en un agitador orbital, sedimentando la resina por centrifugación a 440g durante 1 min utilizando un rotor basculante. Los pasos de lavado se realizaron durante 15 min con 200  $\mu\text{l}$  de solución de unión y lavado (BW) que contenía 50 mM HEPES pH 7.9, 150 mM KCl, 5% glicerol y 0.01% Igepal. Antes de la cromatografía, el extracto de proteínas (600  $\mu\text{g}$ ) se diluyó 1:1 en la solución BW y se preaclará 3 veces con 20  $\mu\text{l}$  de resina cada vez. Los pasos de preaclaredo se realizaron durante 4 h, después de los cuales se eliminó la resina y el extracto de proteínas se transfirió a un tubo nuevo con resina, repitiendo el proceso 3 veces. En paralelo al último paso de preaclaredo, el RNA biotinado (10  $\mu\text{g}$ ) se diluyó en 200  $\mu\text{l}$  de la solución de unión de RNA (5 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl) y se inmovilizó a la resina mediante su incubación con 20  $\mu\text{l}$  de resina durante 1h. Posteriormente, la resina con el RNA inmovilizado se lavó 3 veces con la solución BW para eliminar el exceso de sal y se incubó durante toda la noche con los extractos de proteínas preaclardados. Posteriormente, los complejos RNA-proteína se aislaron por centrifugación, se lavaron 3 veces con BW y las proteínas unidas al RNA se disociaron mediante resuspensión de la resina con 20  $\mu\text{l}$  de tampón de muestra 1X *NuPage* (Invitrogen) con 50 mM DTT e incubación a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. La resina se centrifugó, se recuperó el sobrenadante y se realizó una segunda elución con 12  $\mu\text{l}$  de tampón de muestra, que se mezcló con el primer sobrenadante y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

## 12. METODOLOGÍA UTILIZADA EN LOS ESTUDIOS DE SILENCIAMIENTO GÉNICO

### 12.1. Efecto del silenciamiento de genes celulares sobre la actividad del replicón del TGEV

El silenciamiento génico se llevó a cabo utilizando la tecnología de siRNAs. Inicialmente, tanto la transfección de siRNAs como el silenciamiento génico inducido, se optimizaron en células humanas 293T utilizando un siRNA marcado con Cy3 específico para el gen humano de la GAPDH (Tabla IX). En las condiciones optimizadas, las células 293T se crecieron en placas de 35-mm de diámetro con medio sin antibióticos y cuando alcanzaron el 60% de confluencia se transfectaron con 15 nM de los siRNAs específicos para cada gen (*Silencer Select siRNA*, Ambion) (Tabla IX) y 7.2 µl del reactivo *RNAiMax* (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las células transfectadas se incubaron a 37°C durante 24 h, se levantaron con tripsina/EDTA y se sembraron en placas de 96 pocillos (tratadas previamente con poli-L-lisina) a una confluencia de  $4 \times 10^4$  células/pocillo. A las 48 h después de la primera transfección, las células fueron retransfectadas con 10 nM de los siRNAs e incubadas durante 5 h a 37 °C. En el caso del siRNA#1 de la EPRS (Tabla IX) se requirieron dosis de 50 y 25 nM (para la primera y segunda transfección, respectivamente) para lograr un silenciamiento eficiente. Finalmente, el medio de transfección se retiró y las células se transfectaron con 200 ng del replicón REP2 del TGEV y 0.48 µl de *Lipofectamina 2000* (Invitrogen), según lo descrito previamente (Almazan y col., 2000). A las 36 y 48 hdt con el replicón, el RNA total y las proteínas se recogieron para su posterior análisis. La expresión de los genes celulares silenciados se cuantificó mediante *Western blot* con anticuerpos específicos para cada proteína (Tabla VIII) y mediante Q-RT-PCR utilizando el *High Capacity cDNA Transcription kit* (Applied Biosystems) y ensayos TaqMan (Applied Biosystems) específicos para cada gen (Tabla IX). Con el fin de analizar la actividad del replicón, se cuantificó la síntesis del RNA viral mediante Q-RT-PCR utilizando un ensayo TaqMan específico para el sgmRNA del gen 7 del TGEV (Tabla IX).

### 12.2. Efecto del silenciamiento de genes celulares sobre la infección por TGEV

En este caso, se seleccionaron las células humanas Huh-7 para analizar el efecto del silenciamiento de genes celulares, dada su susceptibilidad a ser infectadas por el aislado TGEV PUR46-C11. Tanto la transfección de siRNAs como el silenciamiento génico se

optimizaron utilizando el siRNA de la GAPDH marcado con Cy3 (Tabla IX), seleccionándose el método de transfección reversa y el reactivo *siPORT Amine* (Ambion). Células Huh-7 ( $5 \times 10^4$ ) en medio sin antibióticos se transfectaron en suspensión con 10 nM de los siRNAs (*Silencer Select siRNA*, Ambion) (Tabla IX) y 2  $\mu$ l del reactivo *siPORT Amine* (Ambion) diluido en 25  $\mu$ l de medio *Opti-MEM 1* (GibcoBRL-Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, las células transfectadas se sembraron en placas de 24 pocillos ( $5 \times 10^4$  células/pocillo) con medio sin antibiótico y se infectaron 48 h después con TGEV PUR46-C11 a una mdi de 5 UFP/célula. A las 36 y 72 hdi, el RNA, las proteínas y el virus extracelular se recogieron para su posterior análisis. La expresión de los genes subcelulares silenciados y la síntesis del RNA viral se cuantificó como se describe en el apartado anterior y la producción viral mediante titulación en células ST (Correa y col., 1988).

**TABLA IX. siRNAs UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO**

siRNA ID <sup>(a)</sup>	Nombre del gen	Nº de ref <sup>(b)</sup>	Secuencia 5' – 3' del siRNA <sup>(c)</sup>
#4390843	Control Negativo #1	#1	Control negativo comercial.
AM4623	Cy3-GAPDH	-	Control positivo comercial.
#4390849	GAPDH	-	Control positivo comercial.
s25665	PABP	#1	CCUAAAUGAUCGCAAAGUAAtt UACUUUGCGAUCAUUUAGGag
s25664	PABP	#2	AUCCAUUGAUAAUAAAGCAAtt UGCUUUUAUUAUCAAUUGGAUtt
s20563	hnRNP Q	#1	GAACGAGUGAAGAAGUUAAtt UUAACUUCUUCACUCGUUCca
s20564	hnRNP Q	#2	CAAUAGAGGUUAUGCGUUUtt AAACGCAUAACCUCUAUUGag
s4767	EPRS	#1	CGAUGUCAGCAUUUCCGUUtt AACGGAAGUGCUGACAUCGtc
s4768	EPRS	#2	CGUUAGAGCUGAUUUACGAtt UCGUAAAUCAGCUCUAACGcg

(a) ID proporcionado por el fabricante (Ambion).

(b) Números de referencia arbitrarios utilizados en este estudio.

(c) Las secuencias de polaridad positiva y negativa se muestran en las filas superiores e inferiores, respectivamente. Todos los siRNAs usados son dúplex sintéticos de 21 nt con 2 nt protuberantes en el extremo 3' (secuencias en minúscula).

### 13. ENSAYO DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS

Para la identificación de proteínas celulares que interaccionan con las RdRp del TGEV se llevó a cabo un ensayo de doble híbrido en levaduras siguiendo procedimientos estándar (Koegl y Uetz, 2007). El ensayo de doble híbrido se realizó en el *German Cancer Research Center* (Alemania) utilizando el plásmido pGBT9-RdRp, el cual expresa la RdRp fusionada con el dominio de unión del factor de transcripción

GAL4, y una librería no redundante con más de 10000 secuencias de genes humanos fusionados al dominio de activación del factor de transcripción GAL4 ([www.dkfz.de/gpcf/fileadmin/Y2H/10kORF\\_library\\_gene\\_IDs.txt](http://www.dkfz.de/gpcf/fileadmin/Y2H/10kORF_library_gene_IDs.txt)), generada en el centro donde se realizó el ensayo (Lamesch y col., 2007).

#### **14. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD POLIMERASA EN VIRIONES PURIFICADOS DEL TGEV**

La actividad RdRp en los viriones purificados del TGEV, se analizó siguiendo métodos previamente descritos (Cheng y col., 2005) con ligeras modificaciones. Para ello, 10 µg de viriones purificados se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.5% durante 10 min a 4°C y se incubaron durante 90 min a 30°C con la mezcla de reacción, que contenía el tampón PB (100 mM KAc, 30 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4), 1 mM DTT, 5 µM UTP, 5 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] UTP, 1.1 mM ATP, 100 µM CTP y GTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 U de inhibidor de RNAsas y 5% glicerol. Las reacciones se realizaron en ausencia o en presencia de 2.5 µg de poliA (Sigma), como molde, y 1 µg de oligoU<sub>16</sub> (Sigma), como iniciador. A continuación, la reacción se paró mediante la adición de 2 µl de 0.5 M EDTA y la radiactividad incorporada se determinó utilizando filtros DE-81 (Whatman) en un contador de centelleo líquido (Wallac 1410).

#### **15. DECLARACIÓN ÉTICA**

Los protocolos de experimentación animal estuvieron en estricta conformidad con la directiva Europea 2010/63/UE y la ley nacional RD 1201/2005 sobre la protección de animales utilizados para experimentación y otros propósitos científicos, así como con la ley nacional 32/2007 referida al bienestar animal en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. Los experimentos se realizaron en el animalario del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC, Madrid) (Número de permiso 28079-29-A) y fueron aprobados por el comité ético del centro (CEEA-CNB).





## **VI. RESULTADOS**

## **1. ESTUDIO DE PROTEÍNAS VIRALES IMPLICADAS EN LA REPLICACIÓN DE CoV**

La identificación en el año 2003 del agente causante del SARS como un CoV (Drosten y col., 2003; Rota y col., 2003) ha impulsado significativamente el estudio de la biología molecular de los CoVs con el fin de desarrollar estrategias efectivas que permitan la prevención y el control de las infecciones causadas por CoV. Una buena estrategia para conseguir estos objetivos consiste en la identificación y caracterización a nivel molecular de las proteínas virales que forman el CRT, y desarrollar drogas antivirales que interfieran con la replicación de CoV.

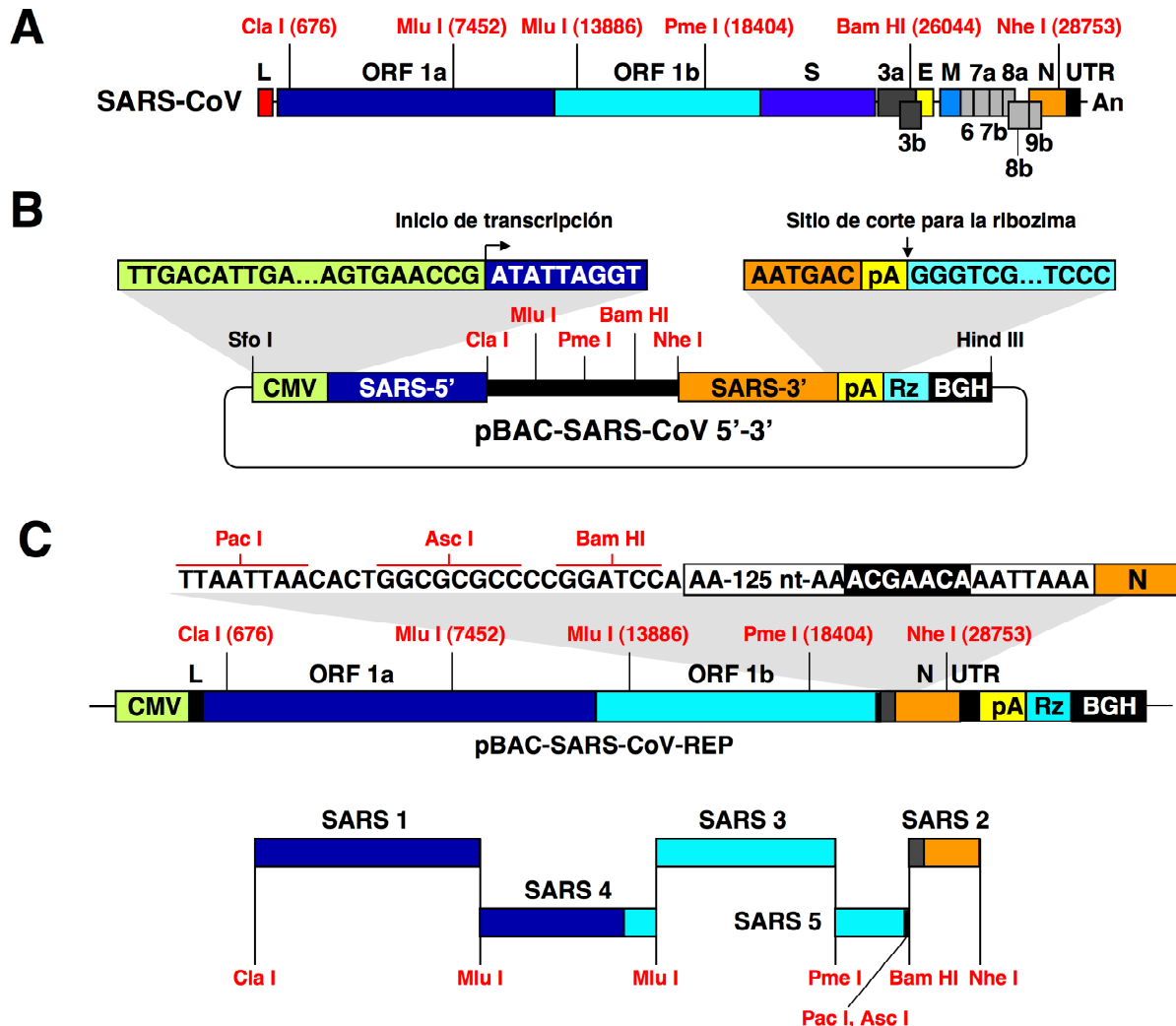
### **1.1. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS ENZIMAS DE PROCESAMIENTO DE RNA DE CoV**

El gen de la replicasa de CoV codifica una serie de enzimas de procesamiento de RNA (Gorbalenya y col., 2006; Snijder y col., 2003; Ziebuhr, 2004), entre las que se incluyen una exoribonucleasa (nsp14 o ExoN), una endoribonucleasa (nsp15 o NendoU) y una 2'-O-ribosa metiltransferasa (nsp16 o 2'-O-MT). Teniendo en cuenta sus actividades enzimáticas, estas enzimas podrían formar parte de un sistema de reparación de errores durante la replicación del genoma viral. Con el fin de analizar esta posibilidad, se ha estudiado el requerimiento de estas enzimas en la síntesis de RNA de CoV mediante genética reversa, utilizando un replicón o RNA autoreplicativo del SARS-CoV.

#### **1.1.1. Construcción y caracterización funcional de un replicón del SARS-CoV**

En base a datos previos obtenidos en nuestro laboratorio que demostraban que además de la replicasa, la proteína N era esencial para la síntesis de RNA de CoV (Almazan y col., 2004; Schelle y col., 2005; Zuñiga y col., 2010), se generó un replicón del aislado Urbani del SARS-CoV que contenía las UTRs 5' y 3' del genoma, el gen de la replicasa y el gen N precedido por 143 nt que incluían su propia TRS. Además, se incluyó un sitio múltiple de clonaje (Pac I, Asc I y Bam HI) después del gen de la replicasa, con el fin de poder clonar y expresar genes heterólogos. El replicón se ensambló en un BAC bajo el control del promotor del CMV y se flanqueó en el extremo 3' con un poliA de 25 nt seguido de la ribozima del HDV y las secuencias de

terminación y poliadenilación de la BGH con el fin de producir RNAs virales con las mismas secuencias en los extremos 5' y 3' que los del genoma viral (Fig. 12).

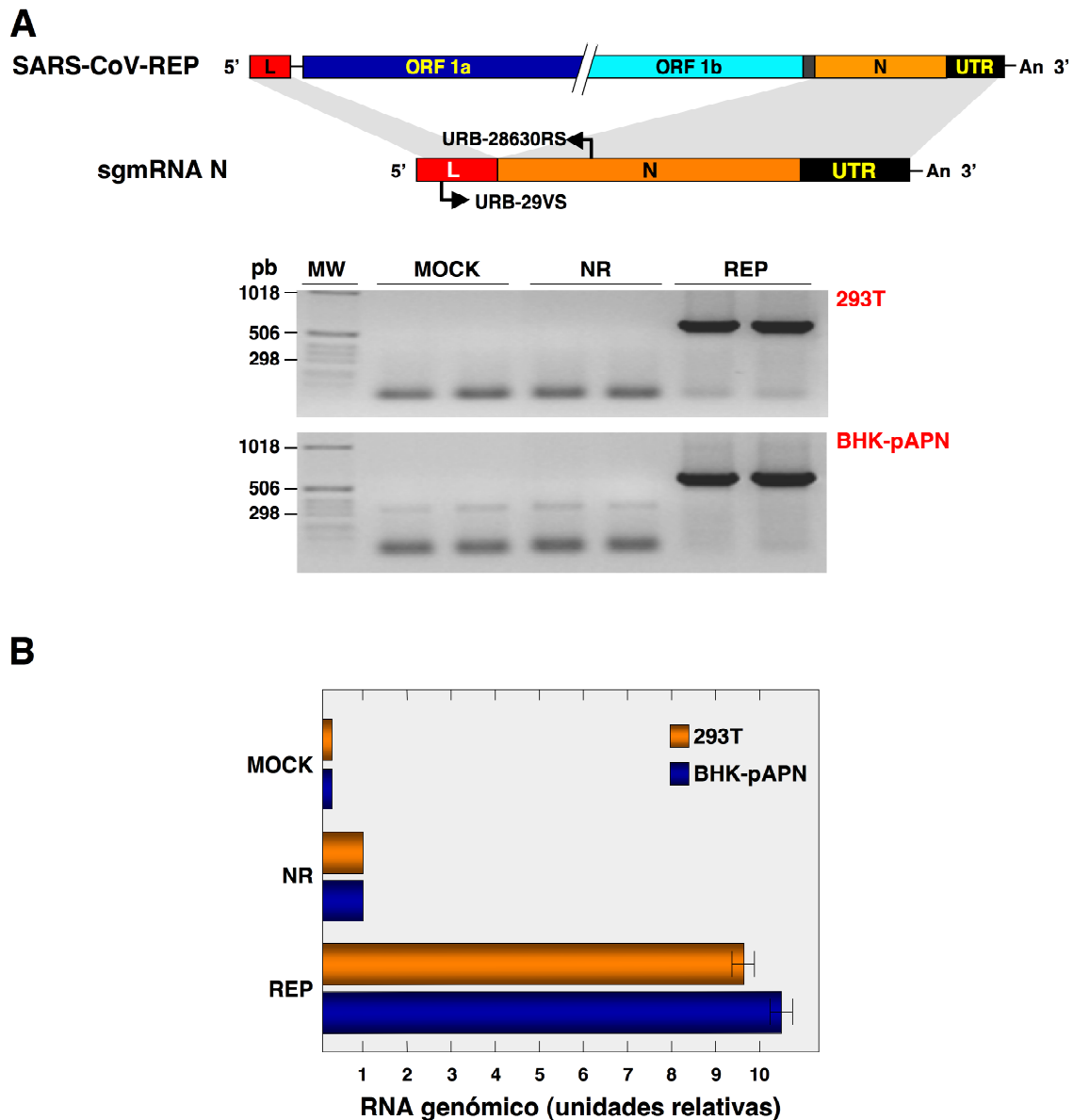


**Figura 12. Estrategia para la construcción de un replicón del SARS-CoV en un BAC.** A) Estructura del genoma del aislado Urbani del SARS-CoV. Se muestran en rojo los sitios de restricción seleccionados para el ensamblaje del replicón. Los números entre paréntesis indican la posición genómica del primer nucleótido del sitio de restricción. Se indican los genes virales, la secuencia líder (L), la región no traducida 3' (UTR) y el poliA (An). B) Esquema del plásmido intermedio pBAC-SARS-CoV 5'-3'. El plásmido incluye el promotor del CMV, los primeros 681 nt del genoma (SARS-5'), un sitio múltiple de clonaje y los últimos 975 nt del genoma (SARS-3') seguidos por un poliA (pA), la ribozima del HDV (Rz) y las secuencias de terminación y poliadenilación de la BGH. Se indican el inicio de la transcripción por el promotor del CMV y el sitio de corte de la ribozima. C) Construcción del replicón a partir del plásmido pBAC-SARS-CoV 5'-3'. El ensamblaje del replicón (pBAC-SARS-CoV-REP) se llevó a cabo mediante el clonaje secuencial de 5 fragmentos solapantes (SARS 1-5) en el plásmido pBAC-SARS-CoV 5'-3'. Con el fragmento SARS-5 se introdujo en el replicón un sitio múltiple de clonaje (Pac I, Asc I y Bam HI) justo detrás del gen de la replicasa. En la parte superior se muestra la estructura genética del replicón, donde se indican la posición de las enzimas de restricción relevantes para el ensamblaje del replicón (rojo), el sitio múltiple de clonaje y la TRS (caja blanca) y CS (caja negra) del gen N. Las abreviaturas utilizadas para designar los genes y los elementos reguladores son los mismos que los descritos en la parte A y B de la figura.

En este sistema, el replicón del SARS-CoV es inicialmente expresado en el núcleo celular por la RNA polimerasa II que reconoce el promotor del CMV y posteriormente, es amplificado en el citoplasma por la replicasa viral. La generación del replicón se llevó a cabo en tres etapas. En una primera etapa se seleccionaron los sitios de restricción en el genoma viral que se utilizaron en el ensamblaje del replicón (Fig. 12A). A continuación, se generó el plásmido intermedio pBAC-SARS-CoV5'-3' como base para la construcción del replicón (Fig. 12B). Este plásmido contenía los primeros 681 nt del genoma viral correctamente fusionados al promotor del CMV, un sitio múltiple de clonaje con los sitios de restricción seleccionados en la primera etapa (Cla I, Mlu I, Pme I, Bam HI y Nhe I) y los últimos 975 nt del genoma, seguidos de un poliA sintético de 25 nt, la ribozima del HDV y las secuencias de terminación y poliadenilación de la BGH. Finalmente, se generaron cinco fragmentos de cDNA solapantes que cubrían la secuencia del replicón mediante RT-PCR, utilizando oligonucleótidos específicos y RNA total de células infectadas como molde. Estos fragmentos se clonaron secuencialmente en el plásmido pBAC-SARS-CoV5'-3' utilizando los sitios de restricción seleccionados anteriormente (Fig. 12C).

Uno de los principales problemas durante la generación de clones infectivos y replicones de CoV utilizando plásmidos convencionales es la inestabilidad que presentan ciertas secuencias del gen de la replicasa cuando se amplifican en *E. coli*. Con el fin de analizar si la utilización de un BAC, que es un plásmido de copia única, podría resolver el problema de inestabilidad, se analizó la estabilidad del replicón durante su propagación en bacterias. Para ello, dos clones que contenían el replicón se crecieron a 30 y 37°C durante 16 h. Las bacterias se diluyeron  $10^6$  veces y se crecieron a 30 y 37°C durante 16 h adicionales, lo que representa aproximadamente 20 generaciones. Este procedimiento se repitió durante seis días consecutivos. El DNA plasmídico se purificó a las 20, 100 y 200 generaciones y se analizó su patrón de restricción con Eco RI y Bgl II. No se observó ninguna diferencia en el patrón de restricción (datos no mostrados), indicando que el replicón generado era estable durante su propagación en *E. coli* durante al menos 200 generaciones.

Una vez generado el replicón y demostrada su estabilidad durante su propagación en bacterias, se analizó su actividad en células 293T y BHK-pAPN. Para ello, el replicón se transfectó en estas células con *Lipofectamina 2000* (Invitrogen) (ver sección 4.6 de Materiales y Métodos) y a las 24 hdt se extrajo el RNA total intracelular y se analizaron



**Figura 13. Caracterización funcional del replicón del SARS-CoV.** A) Análisis de la capacidad transcripcional del replicón. En la parte superior se muestra un esquema de la estructura genética del replicón (SARS-CoV-REP) y del sgmRNA del gen N, donde se indican los genes, los elementos reguladores y los oligonucleótidos utilizados en las RT-PCRs. Células 293T y BHK-pAPN se transfectaron con el replicón (REP), con una construcción no replicativa (NR), o no se transfectaron (MOCK). A las 24 hdt el RNA total se purificó y se analizó la expresión del sgmRNA del gen N mediante RT-PCR usando los oligonucleótidos indicados. En cada caso, el ensayo se realizó por duplicado y los productos de las amplificaciones se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. MW, Marcadores de masa molecular en pares de bases. B) Análisis de la capacidad autoreplicativa del replicón. La actividad replicativa del replicón se determinó mediante la cuantificación por Q-RT-PCR del RNA genómico de cadena positiva (expresada en unidades relativas) de las muestras de RNA (tratadas con DNasa I) recogidas a las 24 hdt con el replicón (REP), en comparación con las células no transfectadas (MOCK) o transfectadas con una construcción no replicativa (NR). Se representa el valor medio de tres cuantificaciones independientes con la desviación estándar indicada con barras de error.

los niveles del sgRNA del gen N mediante RT-PCR utilizando los oligonucleótidos URB-29VS y URB-28630RS (Tabla VI). Como control negativo del experimento, se realizó el mismo análisis en células no transfectadas o transfectadas con un replicón no funcional que carecía de la mayor parte de la secuencia codificante de la RdRp. Se detectaron niveles elevados del sgRNA del gen N en las células transfectadas con el replicón y no así en las células no transfectadas o transfectadas con el mutante de delección no replicativo (Fig. 13A), indicando que el replicón del SARS era funcional en ambas líneas celulares, al menos a nivel de transcripción. Con el fin de confirmar la funcionalidad del replicón en replicación, se analizaron los niveles de RNA genómico de cadena positiva del replicón en comparación con los de la construcción no replicativa. El análisis se llevó a cabo mediante Q-RT-PCR de las muestras tratadas con DNasa I (elimina restos de DNA de la transfección que pudieran ser amplificados en el paso de PCR) utilizando los oligonucleótidos URB-1931VS y URB-1995RS (Tabla VI). En las células transfectadas con el replicón se detectó un incremento de más de 10 veces en el nivel de RNA genómico con respecto al fondo debido al promotor del CMV observado en las células transfectadas con la construcción no replicativa (Fig. 13B), indicando que el replicón del SARS-CoV generado era también funcional a nivel de replicación.

### **1.1.2. Estudio del requerimiento de las proteínas ExoN, NendoU y 2'-O-MT para la síntesis de RNA en CoV**

Con el fin de estudiar el papel de las enzimas de procesamiento de RNA ExoN, NendoU y 2'-O-MT en la síntesis de RNA de CoV, se generó mediante genética reversa utilizando el replicón del SARS-CoV, una serie de mutantes de delección simples de cada enzima, en los cuales se eliminó el dominio catalítico conservado (Snijder y col., 2003) y un mutante de delección para las tres enzimas (Fig. 14A). En todos los casos, los mutantes generados mantuvieron la fase de lectura del gen de la replicasa. El mutante con las tres enzimas delecionadas (REP-Δ3) se generó mediante la eliminación del fragmento Pme I-Pac I del replicón parental. Para la generación de los mutantes de delección simples (REP-ΔExoN, REP-ΔNendoU y REP-Δ2'-O-MT), el fragmento Pme I-Pac I del replicón parental se sustituyó por los correspondientes fragmentos, que contenían las delecciones deseadas, generados mediante PCRs solapantes utilizando oligonucleótidos específicos (Tabla X) y el replicón parental como molde.

TABLA X. OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS PARA LA GENERACIÓN DE REPLICONES MUTANTES EN LAS ENZIMAS DE PROCESAMIENTO DE RNA DEL SARS-CoV

Oligonucleótido <sup>(a)</sup>	Secuencia 5' – 3' <sup>(b)</sup>	Posición <sup>(c)</sup>	Amplicón <sup>(d)</sup>
URB-19012(PmeI)VS	GGTGGGGTTTAAACGGAAGTTCTAC GATGCTCAG	19012-19031	ΔExoN
URB-28008RS	GACAGTTGATAGTAACATTAGGTGT GC	27892-28008	ΔExoN
URB-18375VS	GTTAATGCAAAACCTCCACCAGGTG	18375-18399	ΔNendoU
URB-20153RS	CTCTAAGTCTCTGCTCTGAGTAAAG TAGG	20125-20153	ΔNendoU
URB-20439VS	GGTGGCGTTTAAACCTTTTACTTGAT GACTTTGTCGAG	20439-20462	ΔNendoU
URB-28008RS	GACAGTTGATAGTAACATTAGGTGT GC	27892-28008	ΔNendoU
URB-18375VS	GTTAATGCAAAACCTCCACCAGGTG	18375-18399	Δ2'-O-MT
URB-20588(PacI)RS	GGCAGGTTAATTAATTATTGTAGTT TTGGGTAGAAGGTTTC	20565-20588	Δ2'-O-MT
URB-18375VS	GTTAATGCAAAACCTCCACCAGGTG	18375-18399	ExoN (D6145A)
Exo 18686VS	ATTTATGATTG(C)TGTTTCAGCAGTG GGGCTTTACG	18686-18719	ExoN (D6145A)
Exo 18708RS	ACTGCTGAACA(G)CAATCATAAAT GGGTTATAGAC	18675-18708	ExoN (D6145A)
URB-28008RS	GACAGTTGATAGTAACATTAGGTGT GC	27892-28008	ExoN (D6145A)
URB-18375VS	GTTAATGCAAAACCTCCACCAGGTG	18375-18399	NendoU (H6678A)
End 20283VS	CTTGCGGTCTT(GC)TTTAATGATA GGCTTAGCCAAG	20283-20318	NendoU (H6678A)
End 20309RS	GCCTATCATTA(AA)(GC)AAGACCGCC AAGTTGTCCATG	20274-20309	NendoU (H6678A)
URB-28008RS	GACAGTTGATAGTAACATTAGGTGT GC	27892-28008	NendoU (H6678A)
URB-18375VS	GTTAATGCAAAACCTCCACCAGGTG	18375-18399	NendoU (S6744A)
End 20483VS	GTCAGTGATT(G)CAAAAGTGGTCA AGGTTACAATTGAC	20483-20519	NendoU (S6744A)
End 20507RS	CTTGACCACTTTTG(C)AATCACTGA CAAATCTTGTGAC	20468-20507	NendoU (S6744A)
URB-28008RS	GACAGTTGATAGTAACATTAGGTGT GC	27892-28008	NendoU (S6744A)
URB-18375VS	GTTAATGCAAAACCTCCACCAGGTG	18375-18399	2'-O-MT (D6905)
OM 21185VS	ATCATCATCGG(C)AGCATTTTTAAT TG GGGCTAAC	21185-21218	2'-O-MT (D6905)
OM 21210RS	CAATTAAAAATGCT(G)CCGATGATG ATTGCATTTAC	21177-21210	2'-O-MT (D6905)
URB-28008RS	GACAGTTGATAGTAACATTAGGTGT GC	27892-28008	2'-O-MT (D6905)

(a) Vs, sentido viral o polaridad positiva; RS, sentido antiviral o polaridad negativa.

(b) Las secuencias en cursiva se añadieron para facilitar la restricción del fragmento amplificado. Las bases subrayadas indican dianas de restricción. Las bases entre paréntesis indican los nucleótidos mutados. Las secuencias sombreadas en gris indican la región donde solapan las PCRs.

(c) Posición en el genoma del SARS-CoV. En los oligonucleótidos de sentido inverso se indica la posición de la secuencia complementaria.

(d) Indica el replicón generado, con las mutaciones introducidas entre paréntesis.



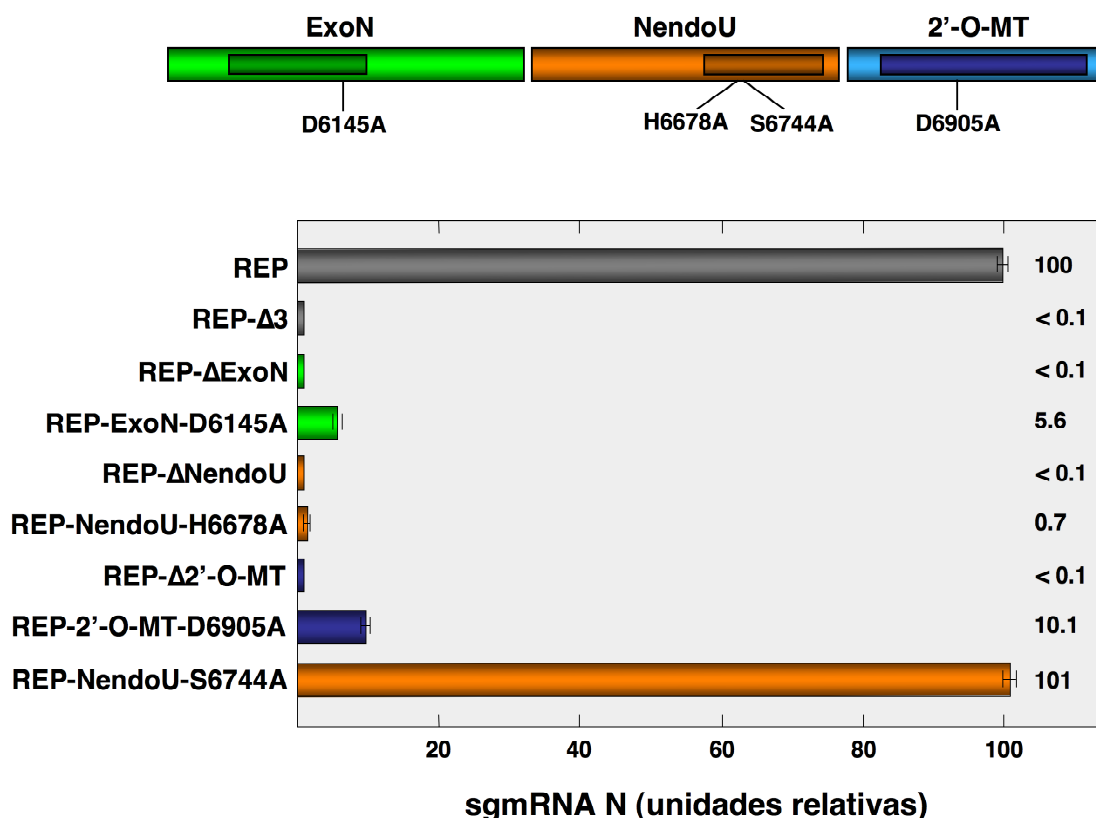
La actividad de los replicones mutantes generados se comparó con la del replicón parental en células 293T y BHK-pAPN, midiendo los niveles de sgRNA del gen N por RT-PCR como en el apartado anterior (Fig. 14B). Solo se detectaron altos niveles de sgRNA en las células transfectadas con el replicón parental, sugiriendo que éstas enzimas de procesamiento eran necesarias para la síntesis de RNA de CoV.



**Figura 14. Construcción y análisis funcional de una colección de replicones del SARS-CoV con delecciones en los dominios catalíticos de la ExoN, NendoU y 2'-O-MT.** A) Estructura genética de los mutantes de delección. Se muestra la estructura genética del replicón parental (REP) en comparación con la de los mutantes de delección simples (REP-ΔExoN, REP-ΔNendoU, REP-Δ2'-O-MT) y el mutante de delección para las tres enzimas de procesamiento de RNA (REP-Δ3). Los dominios conservados de cada enzima se indican con barras mas oscuras. Se indican los sitios de restricción relevantes, la posición genómica de los nucleótidos que flanquean las delecciones, los codones de terminación introducidos (asteriscos) y los sitios de procesamiento para la proteasa 3CL (cabezas de flecha invertidas de color rojo). Las abreviaturas utilizadas para designar los genes y los elementos reguladores son las mismas que se describen en el pie de la figura 12. B) Análisis funcional de los replicones mutantes. Células 293T y BHK-pAPN no se transfectaron (M) o se transfectaron con el replicón parental (REP), los mutantes de delección simples (REP-ΔExoN, REP-ΔNendoU, REP-Δ2'-O-MT) o el mutante de delección para las tres proteínas (REP-Δ3). A las 24 hdt, el RNA intracelular se purificó y la actividad de los replicones se determinó mediante RT-PCR usando oligonucleótidos específicos para detectar el sgRNA del gen N. En cada caso el ensayo se realizó por duplicado y los productos de las amplificaciones se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %. MW, Marcadores de masa molecular en pares de bases (pb).

Aunque las deleciones se realizaron relativamente lejos de los sitios de procesamiento proteolítico de la pp1ab, no se podía excluir la posibilidad de que estas deleciones tuviesen un efecto letal sobre la síntesis de RNA, por estar afectando a la estructura del RNA genómico o al procesamiento proteolítico de la pp1ab. Para excluir esta posibilidad, se generó una colección de replicones con mutaciones puntuales en residuos catalíticos muy conservados de la ExoN (Asp-6145), NendoU (His-6678) y 2'-O-MT (Asp-6905) (Ivanov y col., 2004a; Minskaia y col., 2006; Snijder y col., 2003) (Fig. 15), los cuales se reemplazaron por Ala (D6145A, H6678A, D6905A, respectivamente). Finalmente, como control de que sustituciones de un aa en esta región de la poliproteína pueden ser toleradas, se generó un replicón en donde el residuo de Ser-6744, que no es esencial para la actividad de la NendoU (Ivanov y col., 2004a), se sustituyó por una Ala (S6744A). Estos mutantes puntuales se generaron siguiendo el mismo procedimiento que para la generación de los mutantes de deleción, utilizando los oligonucleótidos indicados en la tabla X.

La actividad de los replicones con mutaciones puntuales se comparó con la de los mutantes de deleción y la del replicón parental en células BHK-pAPN, mediante la cuantificación del sgRNA del gen N por Q-RT-PCR utilizando los oligonucleótidos URB-28163RS y URB-27VS (Tabla VII) (Fig. 15). Mientras que los niveles del sgRNA del gen N fueron muy elevados en las células transfectadas con el replicón original o con el mutante de la NendoU S6744A, en el caso de los replicones con mutaciones puntuales o deleciones se observó una reducción de más del 90% en los niveles de mensajero, confirmando que el efecto en la síntesis de RNA es muy posiblemente debido a la ausencia de actividad de éstas enzimas y no a cambios en la estructura del RNA o en el procesamiento proteolítico de la poliproteína pp1ab. Por otra parte, cuando se analizaron los niveles de RNA genómico de polaridad positiva, se observó una reducción del 10% para todos los replicones mutantes (datos no mostrados), sugiriendo que la ExoN, NendoU y 2'-O-MT son esenciales para la replicación y transcripción eficiente del genoma de CoV.



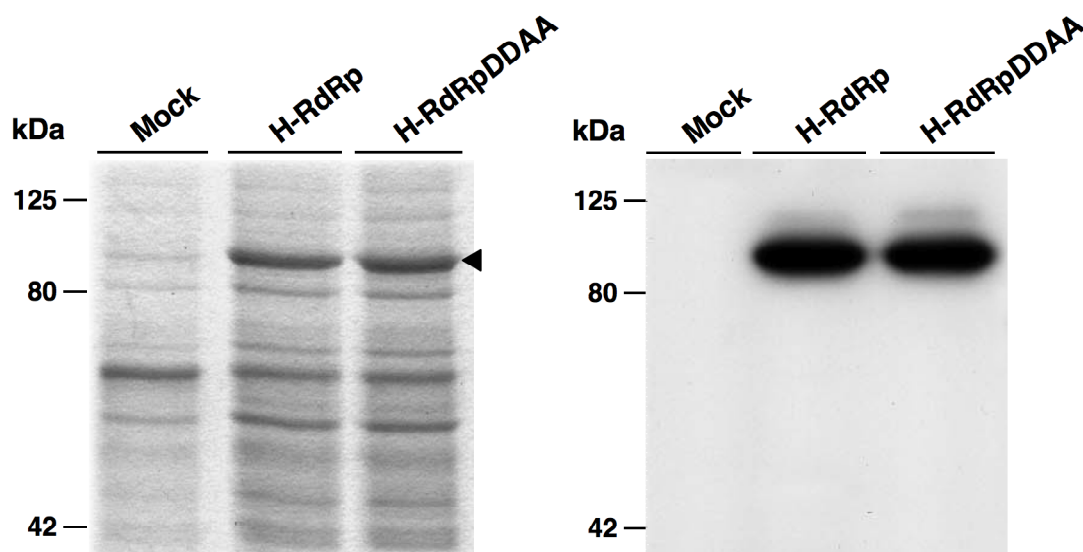
**Figura 15. Construcción y análisis funcional de mutantes puntuales defectivos en la actividad ExoN, NendoU y 2'-O-MT.** En la parte superior se muestra un esquema donde se indican las posiciones de las mutaciones introducidas en la ExoN (D6145A), NendoU (H6678A o S6744A) y 2'-O-MT (D6905A). El número del aminoácido se refiere a su posición en la poliproteína pp1ab. La actividad de los replicones con mutaciones puntuales (REP-ExoN-D6145A, REP-NendoU-H6678A, REP-NendoU-S6744, REP-2'-O-MT-D6905A) se determinó mediante la cuantificación por Q-RT-PCR del sgmRNA del gen N (expresada en unidades relativas) en muestras de RNA purificado a las 24 hdt de células BHK-pAPN y se comparó con la del replicón parental (REP), el mutante de delección para las tres enzimas (REP-Δ3) y los mutantes de delección simples (REP-ΔExoN, REP-ΔNendoU, REP-Δ2'-O-MT). Se representa el valor medio de tres experimentos con la desviación estándar indicada con barras de error.

## 1.2. CARACTERIZACIÓN DE LA RdRp DEL TGEV

Dado que la RdRp es una proteína clave en los procesos de replicación y transcripción del genoma de CoV, su estudio y caracterización es fundamental para conocer el mecanismo de replicación de CoV a nivel molecular y en último término para el desarrollo de estrategias antivirales efectivas frente a la infección por CoV. Con el fin de llevar a cabo este estudio se ha utilizado como modelo de trabajo el CoV TGEV del género  $\alpha$ , el cual, a diferencia del SARS-CoV (patógeno de nivel 3 de seguridad biológica), puede ser manipulado en un laboratorio de nivel de seguridad biológica tipo 2.

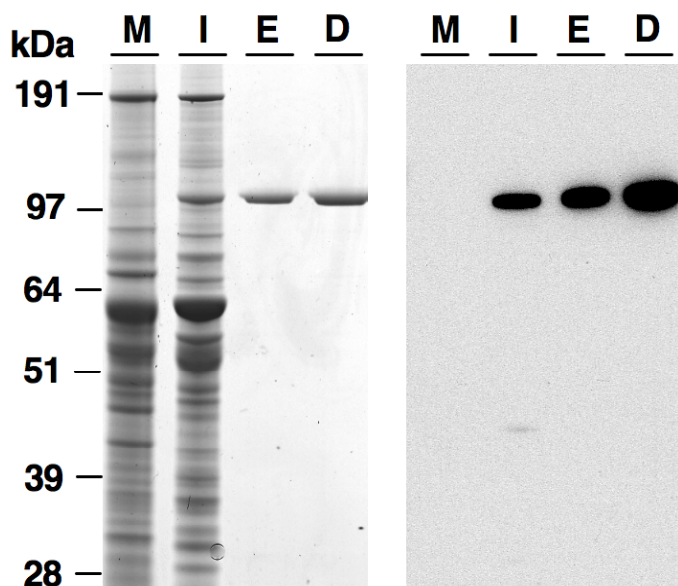
### 1.2.1. Expresión en baculovirus y purificación de la RdRp del TGEV

La disponibilidad de anticuerpos específicos frente a la RdRp es una herramienta fundamental para su estudio y caracterización. Con el fin de generar Acms frente a la RdRp, se generó un baculovirus recombinante (rBV-His-RdRp) que expresaba la RdRp fusionada a una cola de 6xHis en su extremo N-terminal, utilizando el sistema *Bac to Bac* (Invitrogen) como se describe en la sección 6 de Materiales y Métodos. En paralelo y con el fin de reducir la posible toxicidad de la RdRp en células de insecto, se generó un baculovirus recombinante adicional (rBV-His-RdRpDDAA) que expresaba una versión inactiva de la RdRp (RdRpDDAA), en la cual los residuos de Asp en posiciones 4656 y 4657, críticos para su actividad catalítica se sustituyeron por Ala. Para analizar la expresión de la RdRp nativa y mutante, células H5 se infectaron con los baculovirus recombinantes correspondientes a una mdi de 2 UFP/célula. A las 60 hdi, la expresión de las proteínas recombinantes se analizó mediante SDS-PAGE (Fig. 16, panel izquierdo) y *Western blot* (Fig. 16, panel derecho) utilizando un anticuerpo comercial anti-histidinas conjugado a peroxidasa (Tabla VIII). No se observaron diferencias significativas en la expresión de la RdRp nativa o mutada, detectándose en ambos casos un polipéptido mayoritario de aproximadamente 109 kDa que se correspondía con el tamaño esperado para la RdRp fusionada a una cola de 6xHis (Fig. 16). Estos resultados indicaron que la RdRp no era tóxica cuando se expresaba en células de insecto.



**Figura 16. Análisis de la expresión de la RdRp y la RdRpDDAA en baculovirus.** Células H5 no infectadas (Mock) o infectadas a una mdi de 2 UFP/célula con los baculovirus recombinantes que expresan la RdRp nativa o mutada fusionada en su extremo N-terminal a una cola de 6xHis (H-RdRp y H-RdRpDDAA, respectivamente) se analizaron a las 60 hdi mediante SDS-PAGE (10%) y tinción por Coomassie (panel izquierdo) o mediante *Western blot* (panel derecho) utilizando un anticuerpo comercial anti-histidinas (Tabla VIII). La posición de la RdRp recombinante se indica con una punta de flecha. Los marcadores de masa molecular se muestran a la izquierda de cada panel en kDa.

Una vez confirmada la expresión, la proteína recombinante His-RdRp se expresó a gran escala, se purificó mediante IMAC en condiciones no desnaturizantes y se eliminaron las sales utilizando una columna de *Sephadex G-25*, obteniéndose la proteína recombinante con un grado de pureza cercano al 95% y una concentración de 350 µg/ml (Fig. 17).



**Figura 17. Purificación de la His-RdRp.** La His-RdRp se expresó a gran escala y posteriormente se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina de níquel. Se recogieron muestras de los diferentes pasos de la expresión y purificación, las proteínas se separaron por SDS-PAGE (10%) y se analizaron mediante tinción por Coomassie (panel izquierdo) y *Western blot* (panel derecho) utilizando un anticuerpo comercial anti-histidinas (Tabla VIII). M, extracto de células no infectadas; I, extracto de células infectadas con el rBV-His-RdRp; E, proteína recombinante eluida de la columna de níquel; D, proteína recombinante purificada eluida de la columna de *Sephadex G-25*. Los marcadores de masa molecular se indican a la izquierda en kDa.

### 1.2.2. Generación y caracterización de Acms frente a la RdRp del TGEV

Utilizando la proteína recombinante His-RdRp purificada como inmunógeno, se generó una colección de Acms de ratón específicos de la RdRp del TGEV siguiendo el procedimiento descrito en la sección 9.1.1 de Materiales y Métodos. Tras la fusión celular, se identificaron 35 hibridomas positivos mediante ELISA. Los sobrenadantes de estos hibridomas se analizaron por *Western blot* e inmunofluorescencia y los hibridomas con mayor reactividad en ambas técnicas se clonaron dos veces por dilución límite. Los hibridomas seleccionados (4D10, 2C11, 3C12, 2B5, 5H1 y 3F9) se amplificaron y se determinó el isotipo de las inmunoglobulinas (Ig) secretadas mediante ELISA. De los seis Acms, cuatro resultaron ser IgG2a (2C11, 5H1, 3C12 y 2B5), uno IgG2b (3F9) y otro IgG1 (4D10) (Tabla XI). Los seis hibridomas reconocían específicamente la proteína recombinante His-RdRp en células H5 infectadas con el rBV-His-RdRp mediante *Western blot* e inmunofluorescencia (Tabla XI y Fig. 18), sugiriendo que todos los Acms reconocían epítopos lineales. De los Acms de la RdRp, el 5H1 y el 2B5, fueron los que peor reactividad mostraron en ambas técnicas, como cabría esperar por el bajo título de estos anticuerpos (Tabla XI).

TABLA XI. CARACTERIZACIÓN DE LOS Acms ESPECÍFICOS DE LA RdRp DEL TGEV

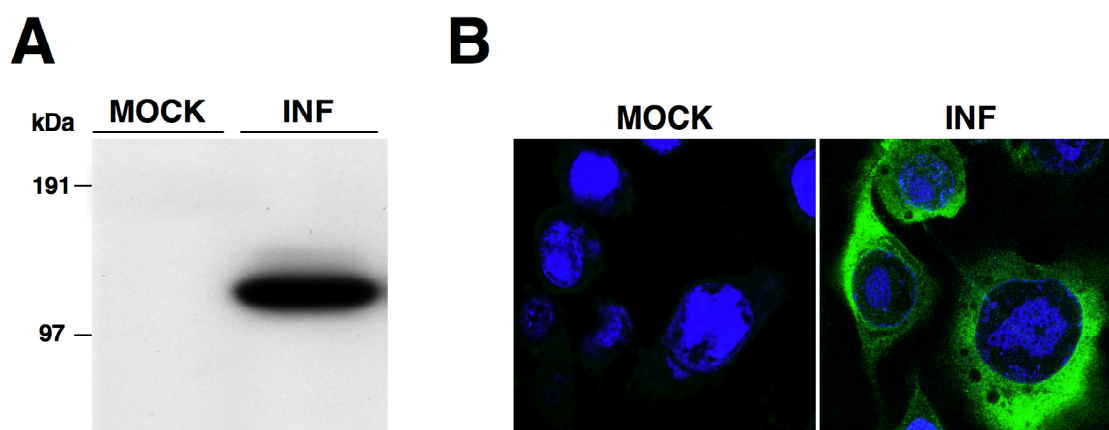
Acm	Título <sup>(a)</sup>	Isotipo	H5 <sup>(b)</sup>		ST <sup>(c)</sup>	
			WB	IF	WB	IF
4D10	1:10000	IgG1	+++	+++	+++	+
2C11	1:50000	IgG2a	+++	+++	++	+++
3C12	1:15000	IgG2a	+++	+++	++	++
2B5	1:3000	IgG2a	+	++	ND	+
5H1	1:2500	IgG2a	+	++	ND	+
3F9	1:25000	IgG2b	+++	+++	++	+

(a) Título del anticuerpo determinado por ELISA.

(b) Células de insecto H5 infectadas con rBV-His-RdRp.

(c) Células porcinas ST infectadas con TGEV PUR46-MAD.

WB, *Western blot*. IF, inmunofluorescencia. ND, No detectado.



**Figura 18. Caracterización de los Acms específicos de la RdRp.** Se muestra la caracterización del Acm 4D10 como un ejemplo representativo del resto de Acms. Células H5 no infectadas (MOCK) o infectadas (INF) con el rBV-His-RdRp a una mdi de 2 UFP/célula, se analizaron a las 60 hdi mediante *Western blot* e inmunofluorescencia. A) *Western blot*. Los extractos celulares se resolvieron mediante SDS-PAGE (10%), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con los Acms de la RdRp (Tabla VIII) y un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (Tabla VIII). Los marcadores de masa molecular se indican a la izquierda en kDa. B) Análisis por inmunofluorescencia. Las células se fijaron con PFA, se permeabilizaron con Triton X-100 y se incubaron con los Acms (Tabla VIII), seguido de la incubación con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado al fluorocromo Alexa-488 (Tabla VIII). Los núcleos se tiñeron con DAPI y las muestras se analizaron por microscopía confocal.

### 1.2.3. Identificación de los epítomos reconocidos por los Acms de la RdRp

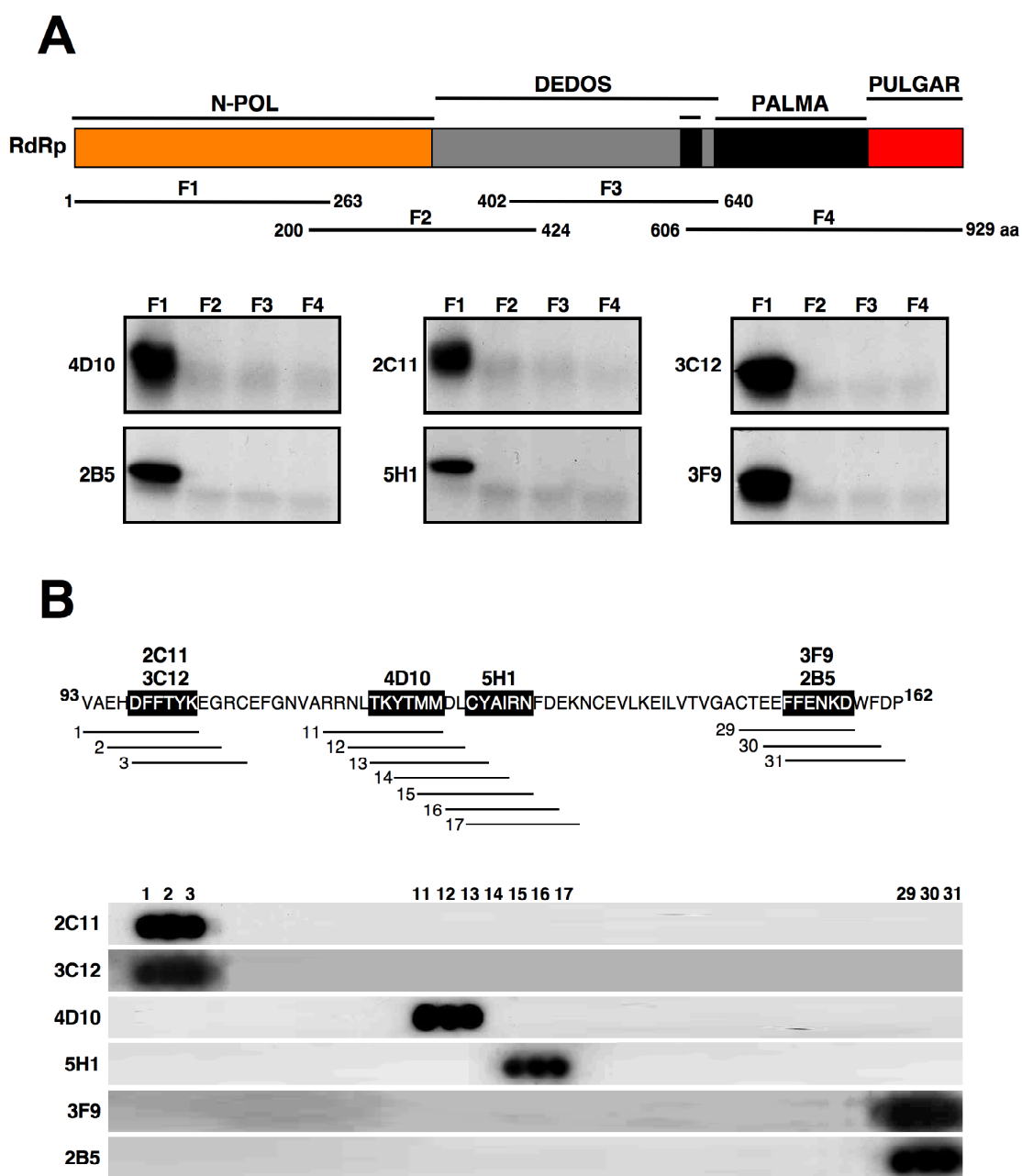
Dado el gran tamaño de la RdRp (105 kDa), la identificación de los epítomos reconocidos por los Acms específicos para la RdRp se llevó a cabo en dos etapas. En una primera etapa, se identificó la región de la RdRp reconocida por los Acms. Para ello, la RdRp se dividió en 4 fragmentos solapantes de aproximadamente 250 aa (F1-F4), atendiendo a los dominios estructurales (N-Pol, dedos, palma y pulgar) de la RdRp. Las secuencias codificantes de los 4 fragmentos se obtuvieron por PCR utilizando oligonucleótidos específicos (Tabla IV), se clonaron en el plásmido pcDNA-3.1(-), se expresaron *in vitro* en un sistema de transcripción-traducción acoplada y se analizó la unión de los Acms a los fragmentos de la RdRp mediante *Western blot*. Los seis Acms reconocieron específicamente el fragmento F1, que contenía los primeros 263 aa de la RdRp (Fig. 19A).

En una segunda etapa, los epítomos específicos reconocidos por los Acms se identificaron mediante “Pepscan” del fragmento F1 (Fig. 19B). Para ello, se generó por el método de *SPOT-synthesis* (Frank, 2002) una matriz de 146 péptidos sintéticos de 10 aa cada uno, solapantes en 8 aa, que cubría el fragmento F1 completo, y se evaluó la unión de los Acms de la RdRp mediante *Western blot*. Se identificaron 4 epítomos lineales no solapantes, DFFTYK (residuos 97 al 102) para los Acms 2C11 y 3C12, TKYTMM (residuos 117 al 122) para el 4D10, CYAIRN (residuos 125 al 130) para el 5H1 y FFENKD (residuos 153 al 158) para el 3F9 y el 2B5. Los cuatro epítomos se localizaron en una región de 62 aa que abarcaba desde el residuo 97 al 158 de la RdRp, indicando que esta región del extremo N-terminal de la RdRp era un dominio inmunodominante.

### 1.2.4. Identificación de la RdRp en células infectadas por el TGEV

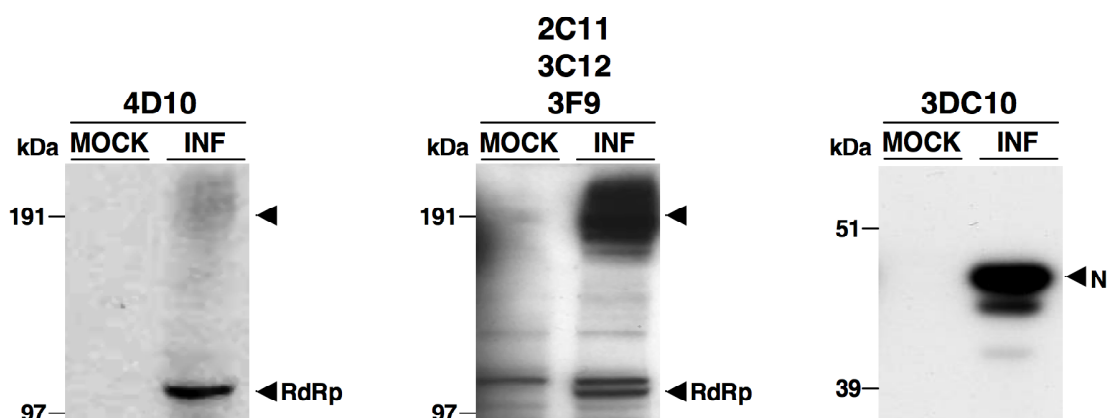
Una vez demostrada la especificidad de los Acms de la RdRp por la proteína recombinante His-RdRp expresada en células de insecto, se analizó la capacidad de estos anticuerpos de reconocer la RdRp viral durante la infección por TGEV. Para ello, se generaron extractos de células ST no infectadas o infectadas con TGEV PUR46-MAD a una mdi de 5 UFP/célula (12 hdi) y la presencia de la RdRp se analizó mediante *Western blot* utilizando los Acms específicos de la RdRp (Tabla VIII). El mismo ensayo se realizó con el Acm 3DC10 (Martín-Alonso y col., 1992) específico para la proteína N (Tabla VIII) como control positivo de la infección viral. De los anticuerpos evaluados,





**Figura 19. Mapeo epitópico de los Acms de la RdRp.** A) Identificación de los dominios de la RdRp reconocidos por los Acms. Cuatro fragmentos solapantes (F1 a F4) que cubrían la secuencia completa de la RdRp, se expresaron *in vitro* y se estudió la unión de los seis Acms a cada uno de los fragmentos mediante *Western Blot*. Los dominios estructurales predichos para la RdRp (N-Pol, dedos, palma y pulgar), así como la localización de los cuatro fragmentos dentro de la secuencia de la RdRp, se muestran en la parte superior de la figura. B) Análisis del fragmento F1 mediante “Pepscan”. Se generó una matriz de péptidos sintéticos que cubrían la secuencia del fragmento F1 (sección 9.1.2 de Materiales y Métodos) y se evaluó con los Acms de la RdRp mediante *Western blot*. Se muestra la posición en la matriz y la secuencia de los péptidos reconocidos por los Acms, así como las secuencias deducidas de los epítomos (cajas negras).

la mayor reactividad se obtuvo con el Acm 4D10 (Tabla VIII), el cual reconoció un polipéptido específico en células infectadas con una masa molecular aproximada de 105 kDa, que se correspondía con la masa molecular predicha para la RdRp (Fig. 20, panel izquierdo). Además de la forma monomérica de la proteína, se identificó una serie de polipéptidos de alta masa molecular ( $> 150$  kDa), que podrían corresponder a oligómeros de la RdRp o precursores del procesamiento proteolítico de la pp1ab. Se obtuvieron resultados similares con los Acms 2C11, 3C12 y 3F9, si bien estos anticuerpos dieron más fondo en el ensayo, detectándose también proteínas celulares de forma inespecífica (Fig. 20, panel central). Finalmente, en el caso de los Acms 5H1 y 2B5 no se detectó ninguna proteína específica en células infectadas, probablemente debido al bajo título de estos anticuerpos (Tabla XI) y a los bajos niveles de expresión de la RdRp durante la infección, en contraposición con el nivel de expresión de otras proteínas virales, como la proteína N (Fig. 20, panel derecho).

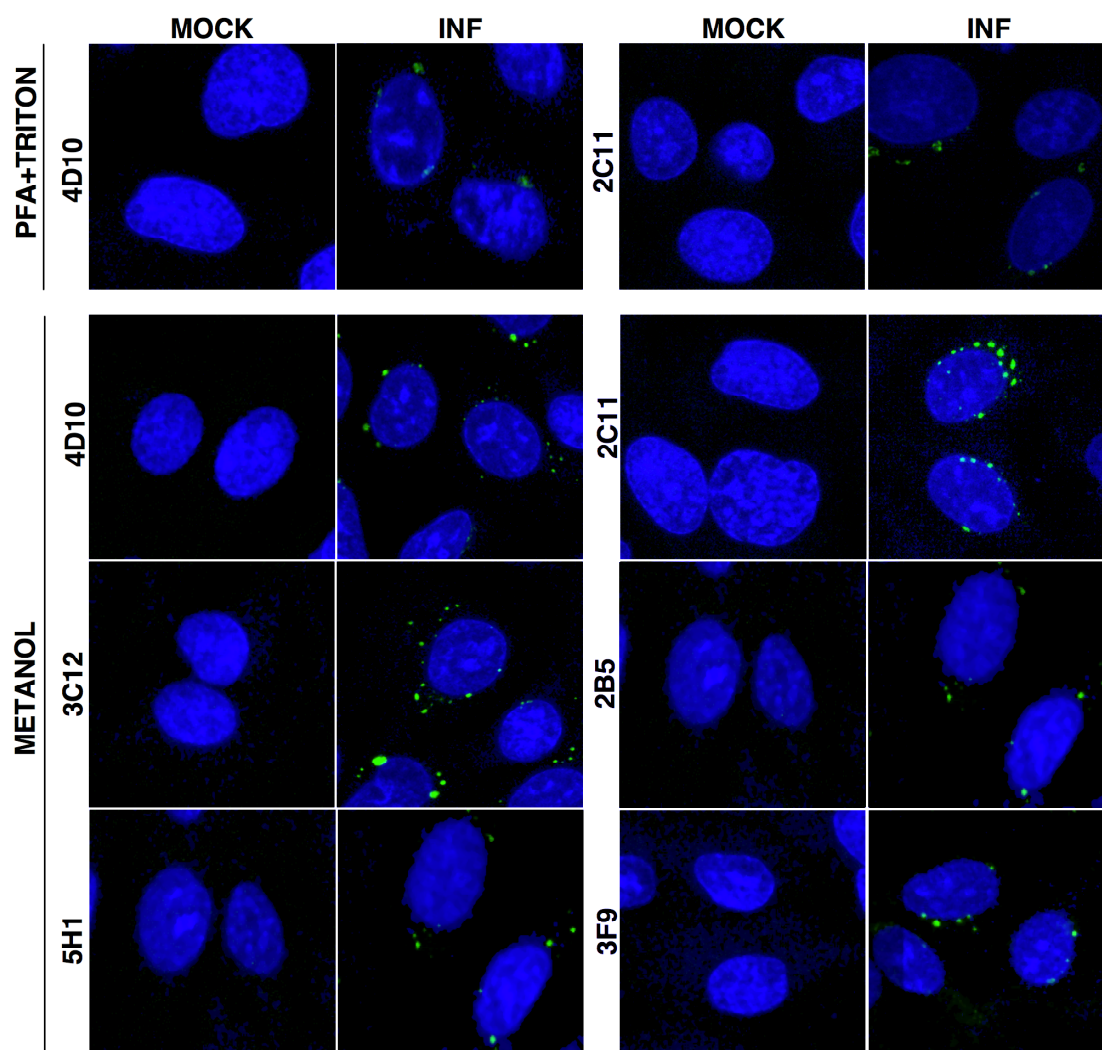


**Figura 20. Identificación de la RdRp en células infectadas.** Extractos de células ST no infectadas (MOCK) o infectadas (INF) con TGEV PUR46-MAD (12 hdi) se separaron por SDS-PAGE (4-12%) y se analizaron mediante *Western blot* con los Acms de la RdRp indicados (paneles izquierdo y central) o con el Acm 3DC10 específico de la proteína N (panel derecho). Las bandas específicas detectadas con los anticuerpos ensayados se indican con puntas de flecha. Los marcadores de masa molecular se indican a la izquierda de cada panel en kDa.

### 1.2.5. Localización subcelular de la RdRp

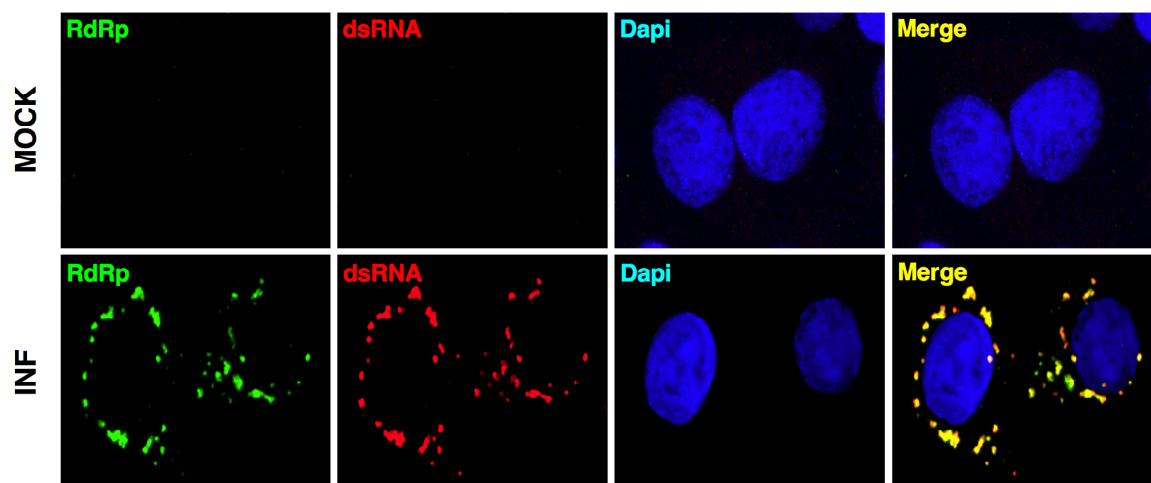
La localización intracelular de la RdRp durante la infección por TGEV se analizó mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal (Fig. 21). En una primera aproximación el análisis por inmunofluorescencia se llevó a cabo en células fijadas y permeabilizadas con PFA y Triton X-100, respectivamente. En estas condiciones experimentales, se observó en células infectadas una señal muy débil y difusa con una

distribución perinuclear (Fig. 21, paneles superiores). Con el fin de incrementar la accesibilidad del antígeno, el análisis se realizó fijando y permeabilizando las células con metanol. En estas condiciones se observó una señal mucho más intensa con todos los Acms, siendo superior en el caso de los Acms 2C11 y 3C12 (Fig. 21, paneles inferiores). En todos los casos, la RdRp mostró un patrón vesicular con una distribución perinuclear que podría corresponderse con las vesículas de doble membrana o VDMs, donde presumiblemente tiene lugar la síntesis de RNA de CoV.



**Figura 21. Localización subcelular de la RdRp en células infectadas mediante inmunofluorescencia.** Células ST no infectadas (MOCK) o infectadas (INF) con TGEV PUR46-MAD a una mdi de 5 UFP/célula durante 12 h, se fijaron y permeabilizaron con PFA y Triton X-100 (paneles superiores) o con metanol (paneles inferiores) y se incubaron con los Acms indicados. Posteriormente, las células se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado al fluorocromo Alexa-488 (Tabla VIII). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y las muestras se analizaron por microscopía confocal. En las muestras fijadas y permeabilizadas con PFA y Triton X-100, se muestra el resultado obtenido con los Acms 4D10 y 2C11, como un ejemplo representativo del resto de los Acms.

Con el fin de confirmar que la RdRp se localizaba en los sitios de síntesis de RNA durante la infección, se analizó mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal la colocalización de la RdRp con el RNA de doble cadena (dsRNA), el cual es un marcador de síntesis activa de RNA de CoV. Debido a que el anticuerpo frente al dsRNA es también un Acm (Tabla VIII), se generó un Acp específico para la RdRp en conejo, utilizando la proteína His-RdRp purificada como inmunógeno (ver apartado 9.2 de Materiales y Métodos) (Tabla VIII). Utilizando el Acp frente a la RdRp generado, se analizó la colocalización con dsRNA en células ST infectadas (mdi de 5 UFP/célula). El análisis se realizó a las 5, 9 y 12 hdi, fijando y permeabilizando las células con metanol. Tanto a las 9 como a las 12 hdi se observó una colocalización perfecta de la RdRp y el dsRNA (Fig. 22) en una estructuras citoplasmáticas posiblemente vesiculares con una distribución perinuclear, confirmando que la RdRp se acumulaba en los sitios de síntesis activa del RNA viral.



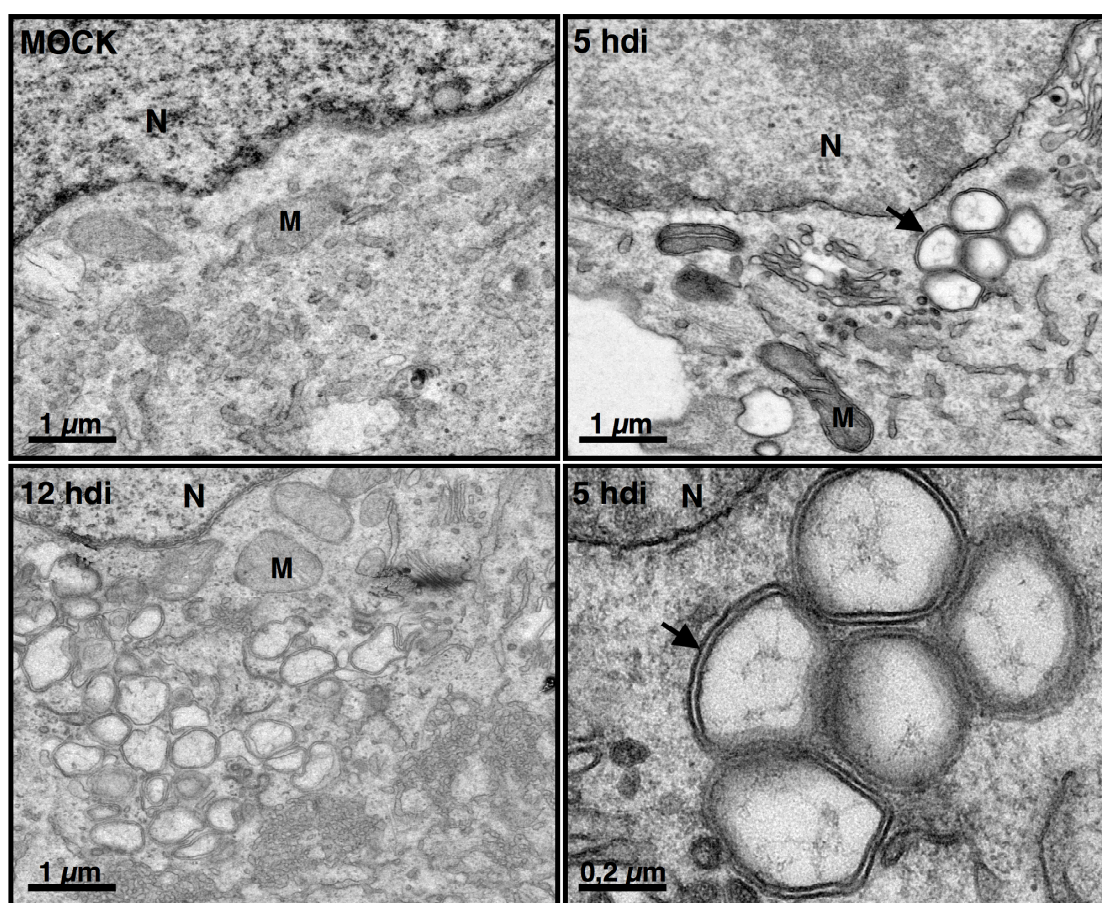
**Figura 22. Análisis de la colocalización de la RdRp y el dsRNA.** Células ST no infectadas (MOCK) o infectadas (INF) con TGEV PUR46-MAD a una mdi de 5 UFP/célula, se fijaron y permeabilizaron con metanol a las 5, 9 y 12 hdi y se analizaron mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal con el Acp frente a la RdRp (verde) y el Acm comercial específico de dsRNA (rojo). Los núcleos (azul) se tiñeron con DAPI. Las colocalizaciones (merge) se muestran en amarillo. No se detectaron diferencias significativas a las 5, 9 y 12 hdi, por lo que solo se muestra el resultado obtenido a las 9 hdi.

#### 1.2.6. Caracterización de las VDMs inducidas por el TGEV

La formación de VDMs durante la infección por CoV solo ha sido demostrada en los CoVs del género  $\beta$  (Gosert y col., 2002; Shi y col., 1999; Sims y col., 2000). Para confirmar la formación de las VDMs en infecciones virales por CoVs del género  $\alpha$ , se llevó a cabo un análisis ultraestructural de células ST infectadas por el TGEV a las 5 y



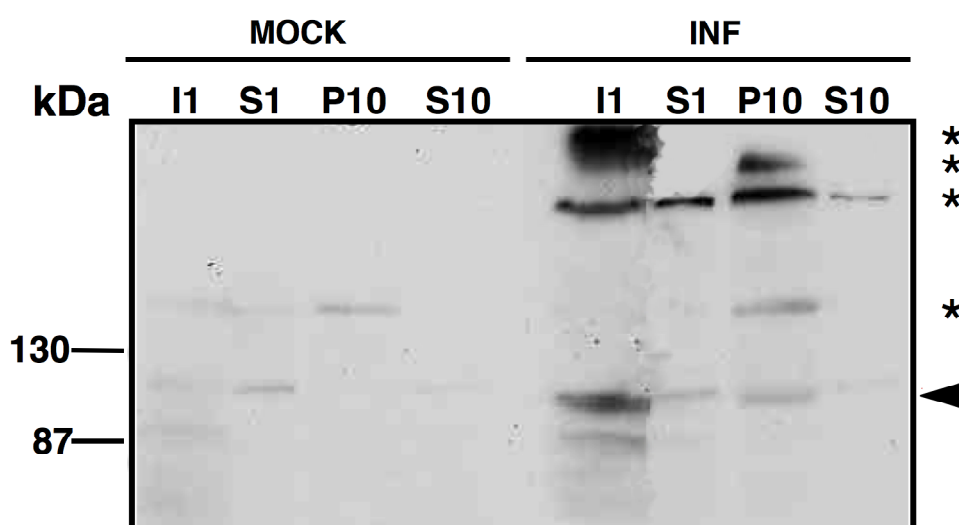
12 hdi, mediante microscopía electrónica convencional (sección 8.5.2 de Materiales y Métodos). El análisis ultraestructural de las células infectadas reveló la presencia de unas vesículas citoplasmáticas perinucleares con un perímetro irregular y de un diámetro variable (aproximadamente 300 nm), las cuales se hicieron patentes a las 5 hdi e incrementaron en número a las 12 hdi (Fig. 23). Un examen detallado de estas vesículas, demostró claramente que presentaban una doble membrana como se había descrito para los CoV del género  $\beta$  (Gosert y col., 2002; Shi y col., 1999; Sims y col., 2000). Además de las VDMs, se observó que durante la infección por TGEV se producía una drástica reorganización de algunos orgánulos celulares, como el complejo de Golgi y el retículo endoplasmático, así como una clara polarización de las mitocondrias hacia las regiones ocupadas por las VDMs, de forma similar a lo descrito para otros virus RNA (Novoa y col., 2005; Ohta y Nishiyama, 2011).



**Figura 23. Identificación de las VDMs en células infectadas mediante microscopía electrónica.** Células ST no infectadas (MOCK) o infectadas con TGEV PUR46-MAD a una mdi de 5 UFP/célula, se fijaron y se procesaron para microscopía electrónica convencional a las 5 y 12 hdi. En el panel inferior derecho se muestra en detalle la estructura de las VDMs, las cuales se identifican con flechas. N, núcleo; M, mitocondria.

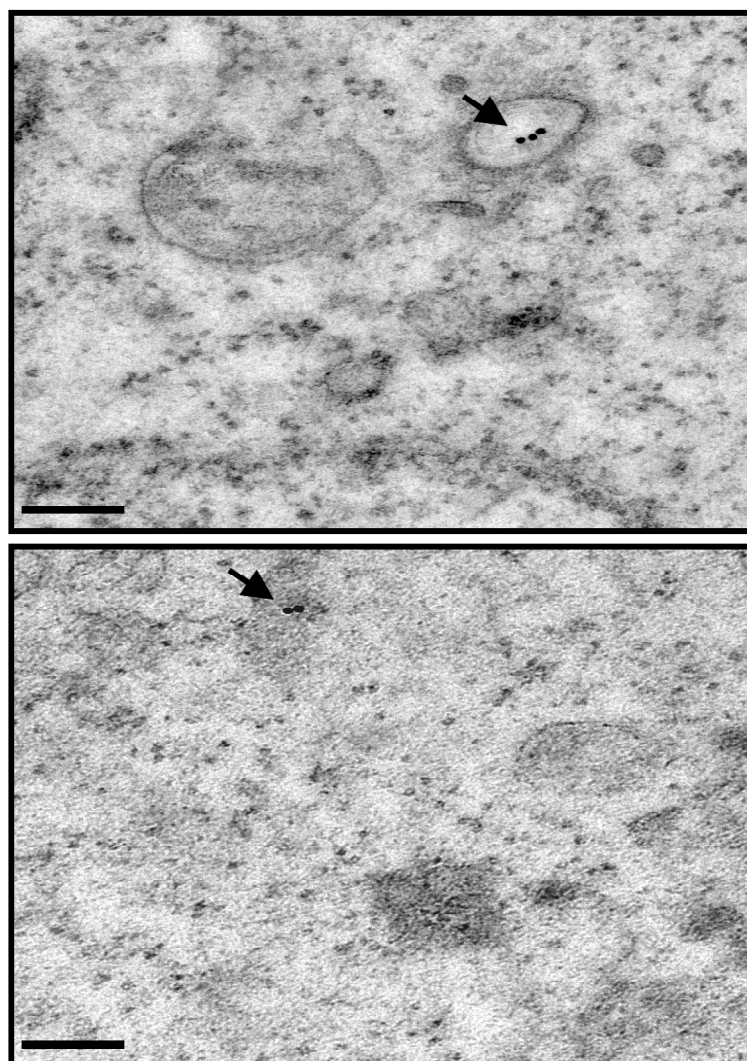
### 1.2.7. Estudio de la presencia de la RdRp en las VDMs

Con el fin de investigar la presencia de la RdRp en las VDMs, estas se purificaron parcialmente mediante centrifugación diferencial, siguiendo procedimientos previamente descritos para el SARS-CoV y el arterivirus EAV (van Hemert y col., 2008a; van Hemert y col., 2008b), y se analizaron mediante *Western blot*. Células ST no infectadas o infectadas con TGEV se recogieron a las 12 hdi en un medio hipotónico y se lisaron en un homogenizador Dounce. Después de restablecer las condiciones isotónicas, los núcleos se sedimentaron por centrifugación a baja velocidad y el sobrenadante se volvió a centrifugar a alta velocidad, obteniéndose un sedimento con la fracción microsomal que contenía las VDMs. El análisis mediante *Western blot* de las fracciones obtenidas utilizando el Acm 4D10 específico de la RdRp (Tabla VIII), mostró un claro enriquecimiento de la RdRp en la fracción donde se encontraban las VDMs (Fig. 24). Además de la forma monomérica de la RdRp, se identificaron bandas específicas de alta masa molecular, las cuales podrían corresponder a oligómeros de la RdRp o precursores del procesamiento proteolítico de la poliproteína pp1ab.



**Figura 24. Identificación de la RdRp en VDMs mediante *Western blot*.** Células ST no infectadas (MOCK) o infectadas (INF) con TGEV PUR46-MAD a una mdi de 5 UFP/célula, se recogieron a las 12 hdi (I1), se lisaron con un homogenizador Dounce y se centrifugaron a baja velocidad para eliminar los núcleos. El sobrenadante (S1) se fraccionó posteriormente mediante centrifugación a 10000g, dando lugar a una fracción soluble (S10) y una insoluble (P10) que contiene las VDMs. Las diferentes fracciones se analizaron mediante *Western blot* utilizando el Acm de la RdRp 4D10. La punta de flecha indica la forma monomérica de la RdRp y los asteriscos polipéptidos de alta masa molecular. Los marcadores de masas moleculares se indican a la izquierda en kDa.

Con el objeto de confirmar la presencia de la RdRp en las VDMs, la localización subcelular de la RdRp se analizó mediante inmunomicroscopía electrónica de células ST infectadas, utilizando el Acm 2C11 purificado (Tabla VIII) y un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a oro (Tabla VIII). El análisis de la distribución de las partículas de oro, indicó que la mayor parte de la RdRp se localizaba en el interior de las VDMs (Fig. 25). En menor proporción, también se observó un marcaje específico fuera de las VDMs, en las regiones en las que estas vesículas se acumulaban, el cual podría deberse a VDMs rotas por la fijación química de las células.



**Figura 25. Identificación de la RdRp en las VDMs mediante inmunomicroscopía electrónica.** Secciones ultrafinas (90 nm) de células ST infectadas por TGEV PUR46-MAD se inmunomarcaron con partículas de oro mediante incubación con el Acm 2C11 purificado seguido de un anticuerpo anti-IgG de ratón asociado a partículas de oro de 5 nm (Tabla VIII). Las partículas de oro se identifican con flechas. Barras, 100 nm.

### 1.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS NSPS 2, 3, 5 Y 8 DEL TGEV

Además de la RdRp, existen otros factores virales codificados en el gen de la replicasa, que probablemente actúen junto con la RdRp en la síntesis de RNA y cuya localización subcelular en CoV del género  $\alpha$  aún no ha sido estudiada. Para realizar estos estudios se seleccionaron la nsp2, cuya función en la síntesis del RNA de CoV es todavía desconocida, las nsps 3 y 5 que contienen los dominios proteasas PLP y 3CL, respectivamente y la nsp8 o primasa.

#### 1.3.1. Generación y caracterización de Acps frente a las nsps 2, 3, 5 y 8 del TGEV

Todos los Acps se generaron en conejo. Los Acps específicos para las nsps 2, 5 y 8 fueron cedidos por el Dr. John Ziebuhr (Justus Liebig University, Alemania) (Tabla VIII), mientras que el Acp frente a las nsp3 fue generado por la empresa *Biomedal*, siguiendo procedimientos estandar (sección 9.2 de Materiales y Métodos) (Tabla VIII). La reactividad y especificidad de los Acps generados se analizó mediante *Western blot* e inmunofluorescencia de células ST infectadas con el TGEV PUR46-MAD a una mdi de 5 UFP/célula durante 12 h (Fig. 26).

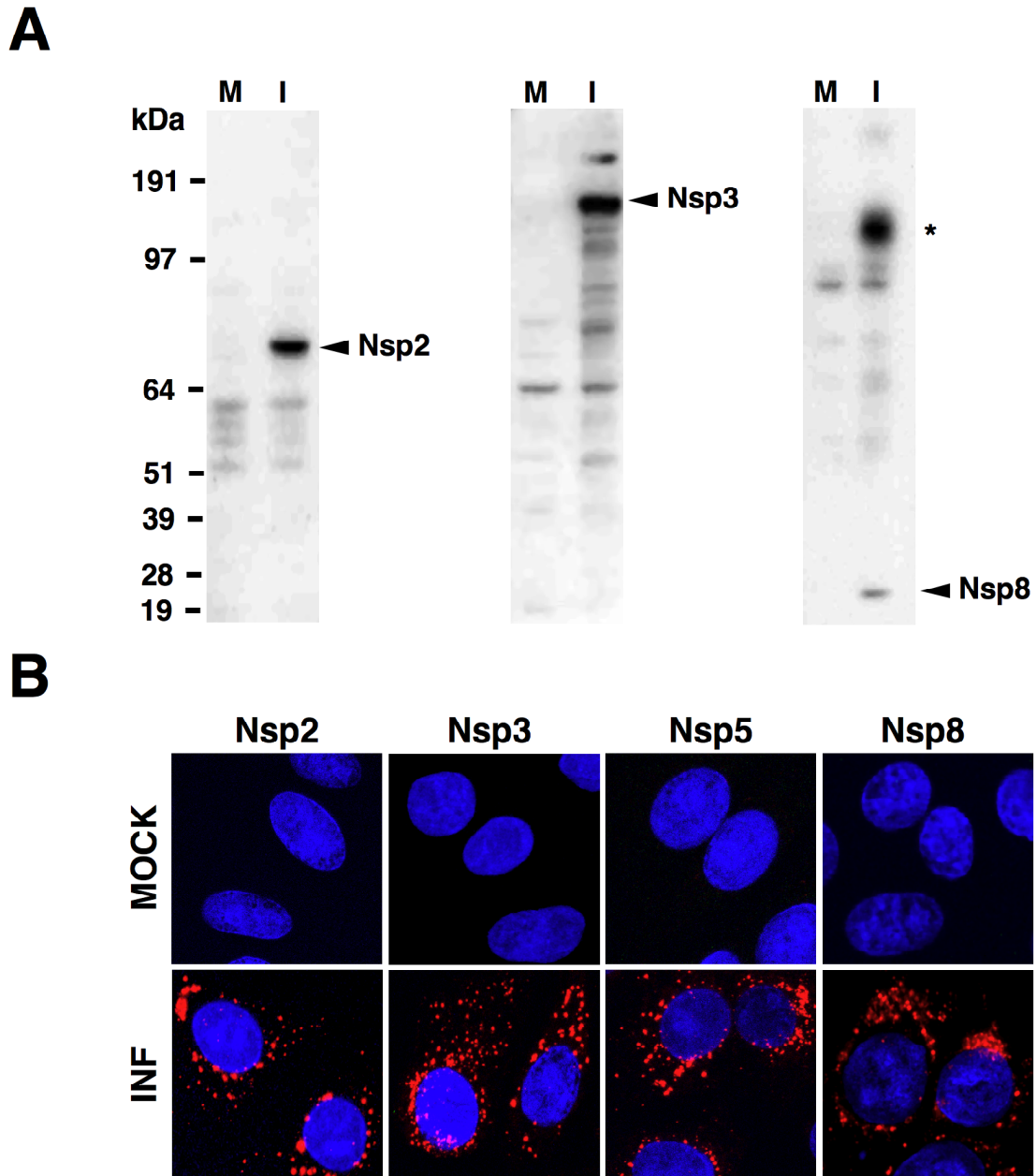
En el análisis mediante *Western blot*, los Acps frente a las nsps 2, 3 y 8 reconocieron específicamente proteínas con masas moleculares de aproximadamente 85, 170 y 21.5 kDa, respectivamente, las cuales se correspondían con la masa molecular esperada para cada una de las proteínas de la replicasa analizadas (Fig. 26A). Sin embargo el Acp específico para la nsp5 no funcionó en esta técnica. En el caso de la nsp8, además del monómero, se identificaron específicamente proteínas de alta masa molecular (Fig. 26A) que, como en el caso de la RdRp, podrían corresponderse con oligómeros o precursores del procesamiento proteolítico de las poliproteínas pp1a y pp1ab.

El análisis por inmunofluorescencia mostró que todos los Acps reconocieron específicamente unas estructuras citoplasmáticas con distribución perinuclear en células infectadas, como las descritas para la RdRp y el dsRNA (Fig. 26B).

#### 1.3.2. Cinética de expresión de la RdRp y las nsps 2, 3 y 8

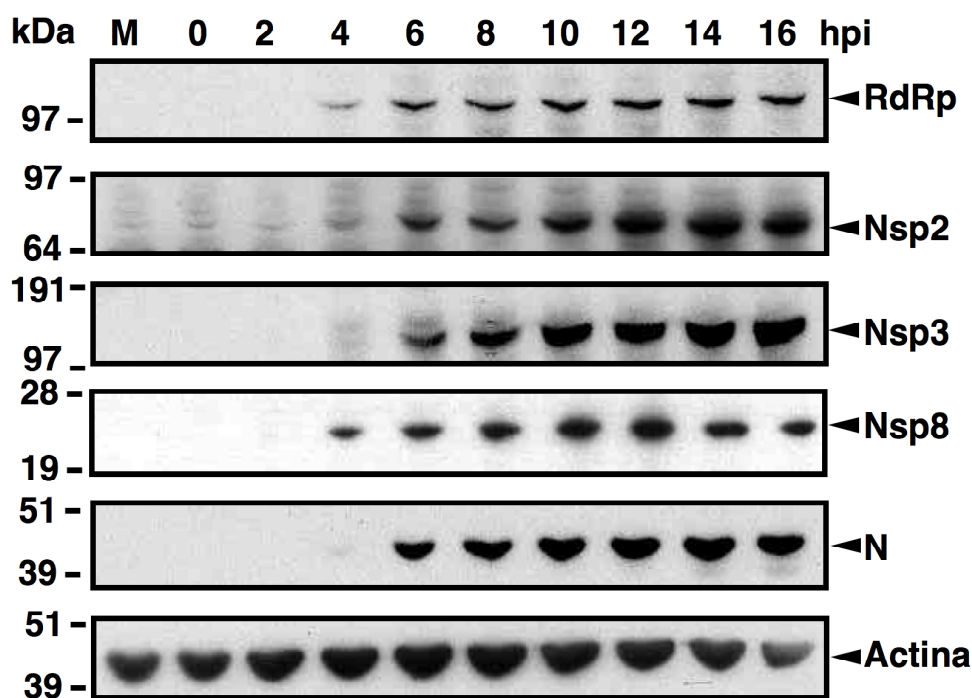
El autoprosesamiento de las poliproteínas generadas a partir del gen de la replicasa durante la infección por TGEV es un proceso complejo, en el que intervienen tres proteasas virales que dan lugar a 16 nsps. De estas proteínas, las que están involucradas en la síntesis de RNA deberían seguir cinéticas de expresión y procesamiento similares durante la infección.





**Figura 26. Caracterización de los Acps frente a las nsps 2, 3, 5 y 8.** A) Análisis por *Western blot*. Extractos de células no infectadas (M) o infectadas (I) con TGEV PUR46-MAD (mdi de 5 UFP/célula) se analizaron a las 12 hdi mediante *Western blot* con los anticuerpos indicados. Con puntas de flecha se indican las formas monoméricas de las proteínas identificadas y con asteriscos los polipéptidos de alta masa molecular. Los marcadores de masa molecular se indican a la izquierda de cada panel en kDa. B) Análisis por inmunofluorescencia. Células ST no infectadas (MOCK) o infectadas (INF) con TGEV PUR46-MAD (mdi de 5 UFP/célula) se fijaron y permeabilizaron a las 12 hdi con metanol, y se analizaron por inmunofluorescencia utilizando los Acps indicados y un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado al fluoróforo Alexa-594 (rojo). Los núcleos (azul) se tiñeron con DAPI y las muestras se analizaron por microscopía confocal.

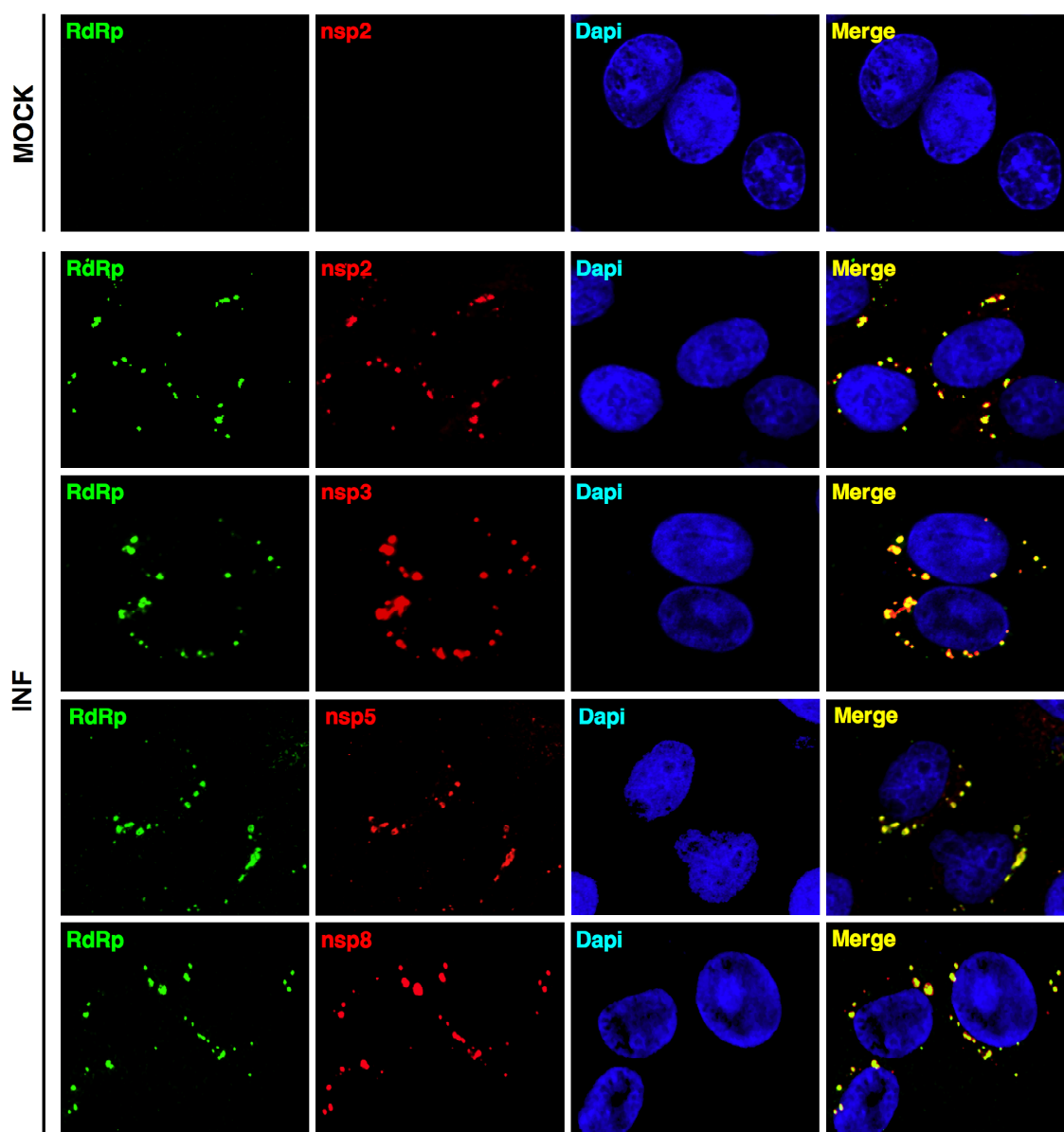
Con el fin de determinar la cinética de expresión de la RdRp y las nsps 2, 3 y 8, se recogieron extractos de células ST infectadas con TGEV a diferentes tiempos después de la infección y se analizaron mediante *Western blot* utilizando el Acm 4D10 específico de la RdRp y los Acps específicos de las nsps 2, 3 y 8 (Fig. 27) (Tabla VIII). En todos los casos la cinética de expresión fue idéntica. Las proteínas se empezaron a detectar a las 4 hdi y se acumularon a lo largo de la infección, alcanzando el máximo a las 12-14 hdi. Finalmente, sus niveles descendieron entre las 14 y 16 hdi. Este descenso en los niveles de acumulación es probablemente debido al efecto citopático causado por la infección, como se infiere del descenso observado en los niveles de actina entre las 14 y 16 hdi. Además de las formas monoméricas, en el caso de la RdRp y nsp8, se detectaron proteínas de alta masa molecular con una cinética similar a la de las formas monoméricas (datos no mostrados). La misma cinética de expresión se detectó para la proteína N que es esencial para la síntesis de RNA en CoVs (Almazan y col., 2004), indicando que las proteínas virales implicadas en la síntesis de RNA viral siguen el mismo patrón temporal de expresión.



**Figura 27. Análisis de la cinética de expresión de la RdRp y las nsps 2, 3 y 8 mediante *Western blot*.** Células ST no infectadas (M) o infectadas con TGEV PUR46-MAD a una mdi de 5 UFP/célula, se recogieron a los tiempos después de la infección indicados (hdi). Las proteínas se analizaron mediante *Western blot* con el Acm 4D10 específico de la RdRp, los Acps frente a las nsps indicadas, el Acm 3DC10 específico de la proteína viral N, como un control interno de la infección, y con el Acm frente a la actina, como un control de carga (Tabla VIII). Los marcadores de masa molecular se indican en kDa a la izquierda de cada panel.

### 1.3.3. Estudio de la colocalización de las nsps 2, 3, 5 y 8 con la RdRp del TGEV

El hecho de que la cinética de expresión y la localización subcelular de las nsps 2, 3, 5 y 8 es prácticamente idéntica a la de la RdRp, permite postular que estas nsps podrían formar parte del CRT y por lo tanto presentar la misma localización espacial que la RdRp en células infectadas.



**Figura 28. Colocalización de las nsps 2, 3, 5 y 8 con la RdRp.** Células ST no infectadas (MOCK) o infectadas con TGEV PUR46-MAD (mdi de 5 UFP/célula) se fijaron con metanol a las 5, 9 y 12 hdi y se analizaron por inmunofluorescencia y microscopía confocal con el Acm 2C11 de la RdRp (verde) y los Acps específicos de las nsps indicadas (rojo). Los núcleos (teñidos con DAPI) se muestran en azul y las colocalizaciones (merge) en amarillo. En las células no infectadas se muestra el marcaje obtenido con los anticuerpos específicos para la RdRp y nsp2 como un ejemplo representativo del obtenido con el resto de anticuerpos. No se detectaron diferencias significativas a las 5, 9 y 12 hdi, por lo que solo se muestra el resultado obtenido a las 9 hdi.

Para confirmar este postulado, se analizó la colocalización de las nsps 2, 3, 5 y 8 con la RdRp mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Para ello, células ST infectadas con el TGEV PUR46-MAD a una mdi de 5 UFP/célula, se fijaron y permeabilizaron con metanol a las 5, 9 y 12 hdi y se analizaron mediante inmunomicroscopía confocal, utilizando los Acps específicos de las nsps 2, 3, 5 y 8 y el Acm 2C11 de la RdRp (Tabla VIII). A todos los tiempos analizados se observó una colocalización perfecta de las nsps con la RdRp en células infectadas, mientras que en células no infectadas no se detectó señal específica con ninguno de los anticuerpos utilizados (Fig. 28). Estos datos, junto con el hecho de que la RdRp colocalizaba con el dsRNA en las VDMs, indican que las nsps 2, 3, 5 y 8 se localizan en las VDMs y muy posiblemente forman parte del CRT responsable de la síntesis del RNA viral.

## **2. ESTUDIO DE PROTEÍNAS CELULARES IMPLICADAS EN LA REPLICACIÓN DE CoV**

En la replicación de CoVs, además de las proteínas codificadas en el gen de la replicasa y la proteína N, presumiblemente intervienen proteínas celulares (Enjuanes y col., 2006a; Sola y col., 2011a; Ziebuhr, 2005), tal como se ha descrito para otros virus RNA de cadena positiva (Brass y col., 2008; Suratanee y col., 2010; Tai y col., 2009; Zhou y col., 2008). En este trabajo, la identificación de proteínas celulares implicadas en la replicación de CoV se ha realizado en base a su interacción con los extremos del genoma o con componentes virales del CRT como la RdRp.

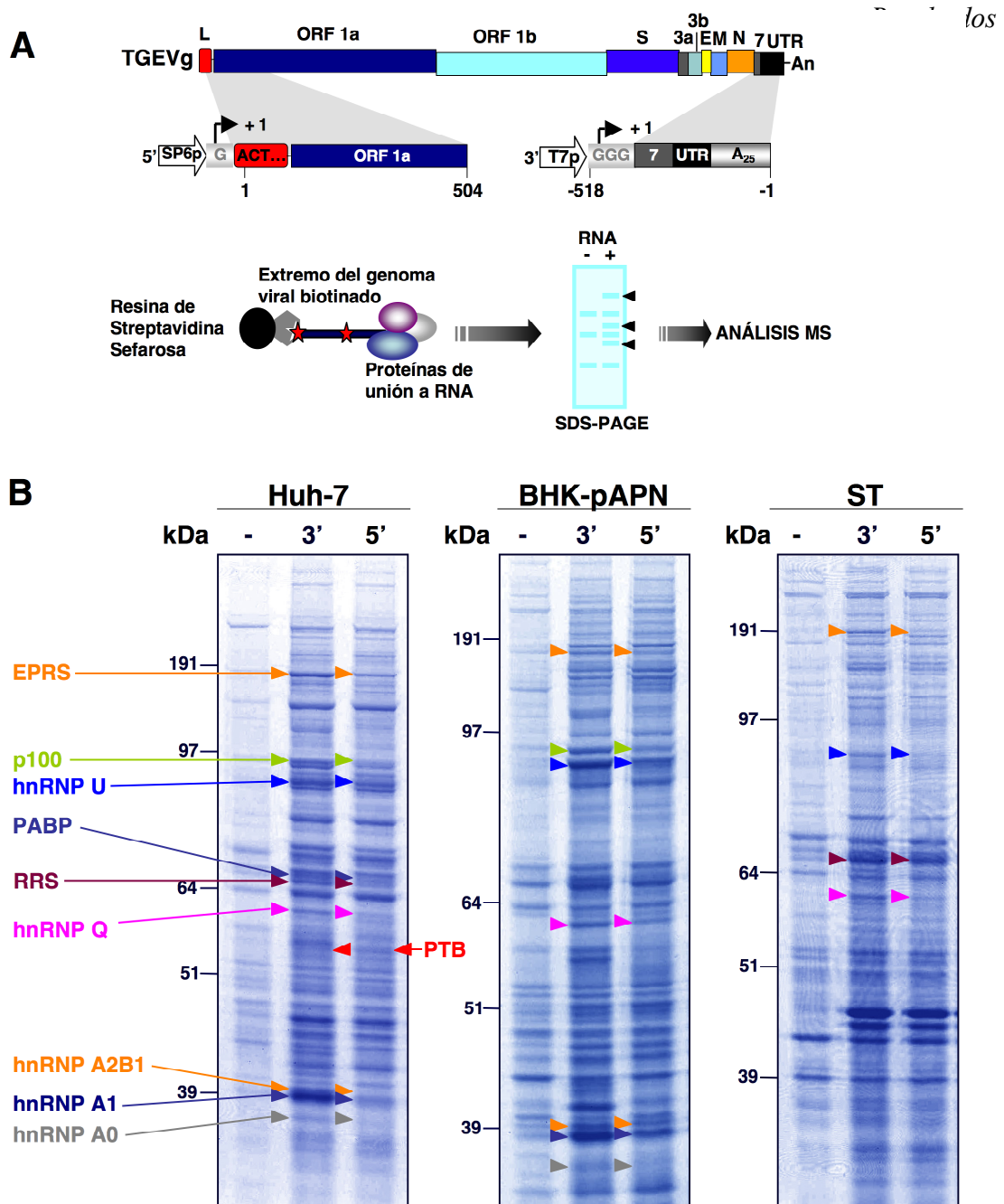
### **2.1. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE PROTEÍNAS CELULARES QUE INTERACCIONAN CON LOS EXTREMOS DEL GENOMA**

Dado que ambos extremos del RNA genómico de CoV son esenciales para la replicación del genoma viral (Brian y Baric, 2005; Sola y col., 2011b) y que por tanto deben contener los sitios de interacción para las proteínas del CRT, se llevó a cabo un estudio exhaustivo de las proteínas virales y celulares que interaccionan con los extremos del genoma viral. En este estudio, las proteínas se aislaron mediante cromatografía de afinidad a RNA, se identificaron por espectrometría de masas y su papel funcional en la replicación de CoV se analizó silenciando su expresión utilizando siRNAs.

#### **2.1.1. Identificación de proteínas celulares que se unen diferencialmente a los extremos del genoma del TGEV**

Con el fin de aislar e identificar proteínas celulares que interaccionan con los extremos del genoma del TGEV, se realizó una cromatografía de afinidad a RNA utilizando como ligando los extremos del genoma viral marcados con biotina y extractos citoplasmáticos de células infectadas como fuente de proteínas (Fig. 29). Para ello, se sintetizaron dos RNAs sintéticos que contenían los primeros 504 nt del extremo 5' del genoma viral y los últimos 493 nt del extremo 3' más un poliA de 25 nt. Estos RNAs, se sintetizaron mediante transcripción *in vitro* utilizando como moldes el amplicón PCR-5'TGEV y el plásmido pM33L-3'TGEV (linearizado con Hind III y tratado con *MungBean*), respectivamente. La longitud de los transcritos se seleccionó en

base a las secuencias requeridas en ambos extremos para la replicación de minigenomas o RNAs defectivos del TGEV (Escors y col., 2003; Izeta y col., 1999). Ambos transcritos se marcaron con biotina durante la transcripción *in vitro* utilizando una relación molar 1:1.25 de biotina-14-CTP con respecto al nucleótido no marcado, con el fin de conseguir un marcaje lo suficientemente espaciado para minimizar el posible efecto de los grupos de biotina sobre la conformación del RNA. Posteriormente, los RNAs biotinados de los extremos del genoma se inmovilizaron en una resina de estreptavidina y se incubaron con extractos citoplasmáticos de células porcinas ST y BHK-pAPN de hámster infectadas con el aislado PUR46-MAD del TGEV. Para facilitar la identificación de las proteínas en las bases de datos, el ensayo se realizó en paralelo con extractos de células humanas Huh-7 infectadas con el aislado PUR46-C11 del TGEV. Los complejos RNA-proteína se aislaron mediante centrifugación y las proteínas se analizaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida en gradiente *NuPAGE 4-12% Bis-Tris* (Invitrogen) y tinción con azul de Coomassie utilizando el reactivo *Simple Blue SafeStain* (Invitrogen) (Fig. 29 A). Como control de unión inespecífica de las proteínas a la resina, se realizó en paralelo una cromatografía sin RNA para cada tipo celular. El patrón de proteínas aisladas por su afinidad con el extremo 5' o 3' del genoma fue muy similar. Sin embargo, una pequeña proporción de ellas mostraban una unión preferencial por uno de los extremos del genoma. Esta preferencia se reprodujo en la mayoría de los casos en los 3 tipos celulares analizados (Fig. 29 B). La cromatografía de afinidad a RNA se repitió 3 veces y las proteínas que mostraron una unión preferencial por uno de los extremos del genoma se recortaron del gel y se identificaron por espectrometría de masas. Se identificaron 10 proteínas de forma reproducible en al menos 2 de los 3 experimentos realizados con una puntuación estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) asignada por el programa MASCOT (Tabla XII). El porcentaje de identificaciones varió dependiendo del origen de la línea celular utilizada como fuente de proteínas, siendo del 100% para la línea celular humana Huh-7, del 70% para la línea celular de hámster BHK-pAPN y del 60% para la línea celular porcina ST.



**Figura 29. Aislamiento e identificación de proteínas que interaccionan con los extremos del genoma.** A) Esquema de la cromatografía de afinidad a RNA. En la parte superior se muestra el genoma del TGEV, donde se indican los genes virales, la secuencia líder (L) y la secuencia 3' UTR (UTR). Debajo se muestran los esquemas de los moldes de transcripción usados para la generación de los extremos 5' y 3' del genoma, donde se indican los promotores de los fagos SP6 (SP6p) y T7 (T7p), las "G" no virales incluidas en la secuencia para incrementar los niveles de transcripción, los sitios de iniciación de la transcripción (+1) y la posición en el genoma de los RNAs utilizados en la cromatografía de afinidad. En la parte inferior se muestra el procedimiento seguido para el aislamiento de proteínas que interaccionan con los extremos del genoma mediante cromatografía de afinidad a RNA y su posterior identificación mediante espectrometría de masas (MS). B) Identificación de proteínas que interaccionan diferencialmente con los extremos del genoma. Las proteínas que interaccionan con los extremos 5' y 3' del genoma se aislaron mediante cromatografía de afinidad a RNA a partir de extractos de células Huh-7, BHK-pAPN y ST infectadas con TGEV, se separaron por SDS-PAGE (4-12%) y se tiñeron con azul de Coomassie. Las proteínas que mostraron una unión preferencial por uno de los extremos, se cortaron y se identificaron por MS. Las proteínas identificadas se enumeran en el gel de las proteínas aisladas a partir del extracto de células Huh-7. Las proteínas correspondientes aisladas a partir de los extractos de células BHK-pAPN y ST se indican con puntas de flecha. Las hnRNPs A1 y A2B1, que no se indican en el gel de las células ST, se identificaron en otros experimentos (Tabla XII). Los marcadores de masa molecular se indican en kDa a la izquierda de cada gel.

De las 10 proteínas identificadas, solo la PTB mostró una unión preferencial por el extremo 5' del genoma, mientras que el resto se unían preferentemente al extremo 3'. Entre estas últimas se incluían varias hnRNPs (A1, A0, A2B1, Q y U) implicadas en el metabolismo y procesamiento del RNA, los factores de traducción EPRS, arginil-tRNA sintetasa (RRS) y PABP, y el co-activador transcripcional p100 (Fig. 29B y Tabla XII).

**TABLA XII. PROTEÍNAS AISLADAS POR SU UNIÓN DIFERENCIAL A LOS EXTREMOS DEL GENOMA DEL TGEV**

RNA	Nº Acceso	Proteína	Función <sup>(a)</sup>	S/SS/BD <sup>(b)</sup>	L.Cel. <sup>(c)</sup>	N <sup>(d)</sup>
3'TGEV	gi 4504445	hnRNP A1	<i>Splicing</i> , procesamiento y transporte de RNA	107/70/m	H, B, S	3
3'TGEV	gi 4504447	hnRNP A2B1	<i>Splicing</i> y transporte de RNA	165/65/Hs	H, B, S	3
3'TGEV	gi 5803036	hnRNP A0	<i>Splicing</i>	76/65/Hs	H, B	3
3'TGEV	gi 3202000	hnRNP U	<i>Splicing</i> y procesamiento de RNA	136/78/nr	H, B, S	3
3'TGEV	gi 44888326	hnRNP Q	<i>Splicing</i> y procesamiento de RNA	321/76/nr	H, B, S	3
3'TGEV	gi 693937	PABP	<i>Splicing</i> y estabilización de RNA	84/69/m	H	3
3'TGEV	gi 5803036	EPRS	Traducción	269/78/nr	H, B, S	3
3'TGEV	gi 3058627	RRS	Traducción	111/76/nr	H, B	2
3'TGEV	gi 60415925	P100	Transcripción	363/76/nr	H, B	3
5'TGEV	gi 131529	PTB	<i>Splicing</i>	82/50/nr	H	2

(a) Función biológica descrita.

(b) Los parámetros de los datos de proteómica se indican como: S, valor asignado por el programa MASCOT; SS, valor a partir del cual la identificación es estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). Las búsquedas se llevaron a cabo en la base de datos (BD) del NCBI sin restricciones (nr) o con restricciones taxonómicas para humanos (Hs) o mamíferos (m).

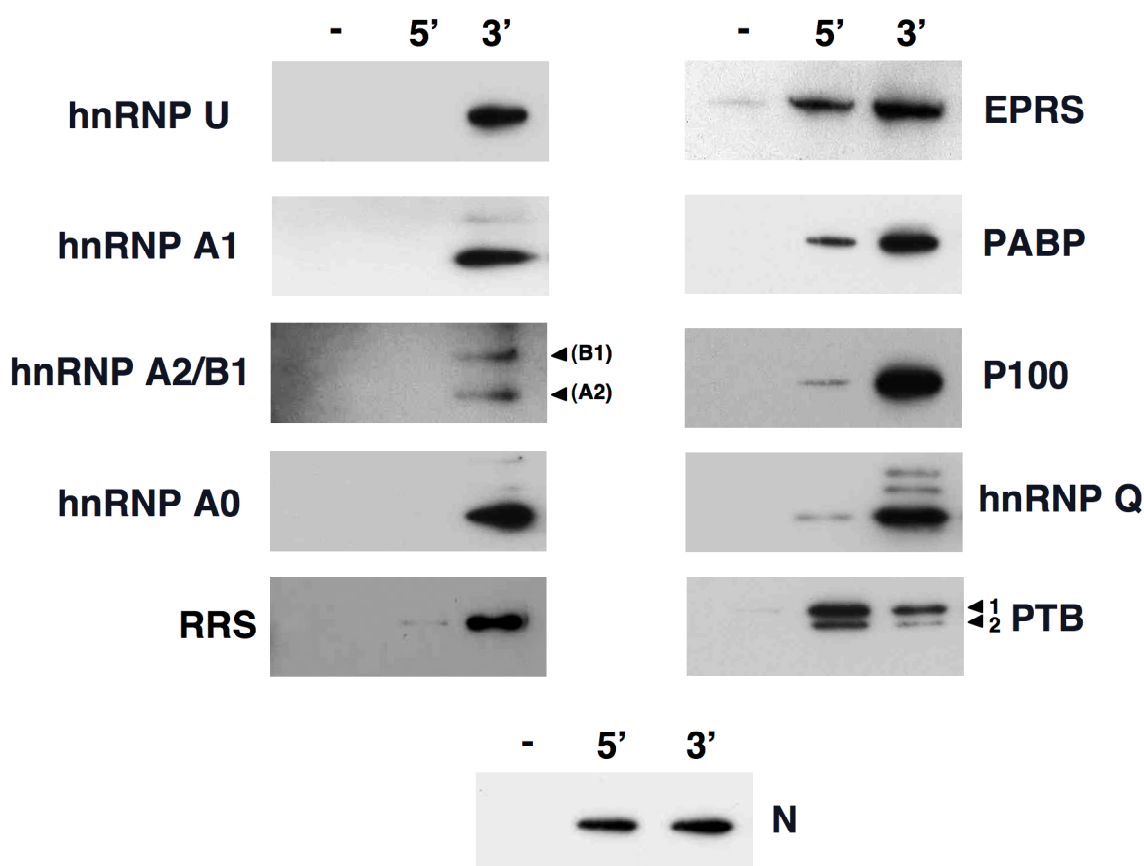
(c) Se indica la línea celular en la que se identificó la proteína. H, células Huh-7 humanas; B, células BHK-pAPN de hámster; S, células ST porcinas.

(d) Número de veces que se identificó la proteína.

Una vez identificadas las proteínas celulares que se unían diferencialmente a los extremos del genoma viral, su identidad y unión preferencial a uno de los extremos del genoma se analizó mediante *Western blot* de las proteínas aisladas por afinidad a partir de los extractos de células Huh-7 infectadas, utilizando anticuerpos específicos (Tabla VIII) para cada una de las proteínas (Fig. 30). Además, se analizó la presencia de la proteína viral N, que interacciona con ambos extremos del genoma, como control de la cantidad de proteína cargada en el gel. Los datos obtenidos confirmaron la unión



preferencial de las proteínas analizadas al extremo 5' o 3' del genoma, si bien esta preferencia fue algo mas moderada en el caso de las proteínas EPRS, PABP, p100, hnRNP Q y PTB (Fig. 30). Resultados similares fueron obtenidos con los extractos procedentes de células ST y BHK-pAPN infectadas (datos no mostrados). Recientemente en nuestro laboratorio, se han identificado los dominios de RNA del extremo 3' del genoma implicados en estas interacciones (S. Márquez, resultados no publicados).



**Figura 30. Análisis por *Western blot* de las proteínas que se unen preferencialmente a uno de los extremos del genoma.** Las proteínas que interaccionan con los extremos 5' y 3' del genoma se aislaron mediante cromatografía de afinidad a RNA a partir de extractos de células Huh-7. Posteriormente, estas proteínas se identificaron mediante *Western blot* utilizando los anticuerpos específicos de las mismas. Como control de carga, se evaluó la presencia de la proteína viral N, la cual interacciona con ambos extremos del genoma. En el caso de la hnRNP A2B1 y la PTB, las diferentes isoformas detectadas con los anticuerpos correspondientes se indican con puntas de flecha.

### **2.1.2. Análisis funcional de las proteínas que interaccionan preferencialmente con el extremo 3' del genoma**

Dado que la primera etapa de los procesos de replicación y transcripción del RNA viral implica el reconocimiento del extremo 3' del genoma por el CRT, se seleccionaron las proteínas que se unían preferentemente al extremo 3' del genoma para estudiar su papel en la síntesis de RNA de CoV. Este estudio se realizó utilizando la tecnología de silenciamiento génico con siRNAs.

#### **2.1.2.1. Efecto del silenciamiento génico de las proteínas que interaccionan con el extremo 3' del genoma sobre la síntesis de RNA de CoV**

Con el fin de analizar la relevancia funcional de las proteínas que interaccionan con el extremo 3' del genoma en la síntesis de RNA del TGEV, se silenció su expresión en células 293T con siRNAs específicos para cada gen (Tabla IX) y se evaluó el efecto del silenciamiento en la actividad del replicón del TGEV mediante la cuantificación por Q-RT-PCR de los niveles del sgRNA del gen 7.

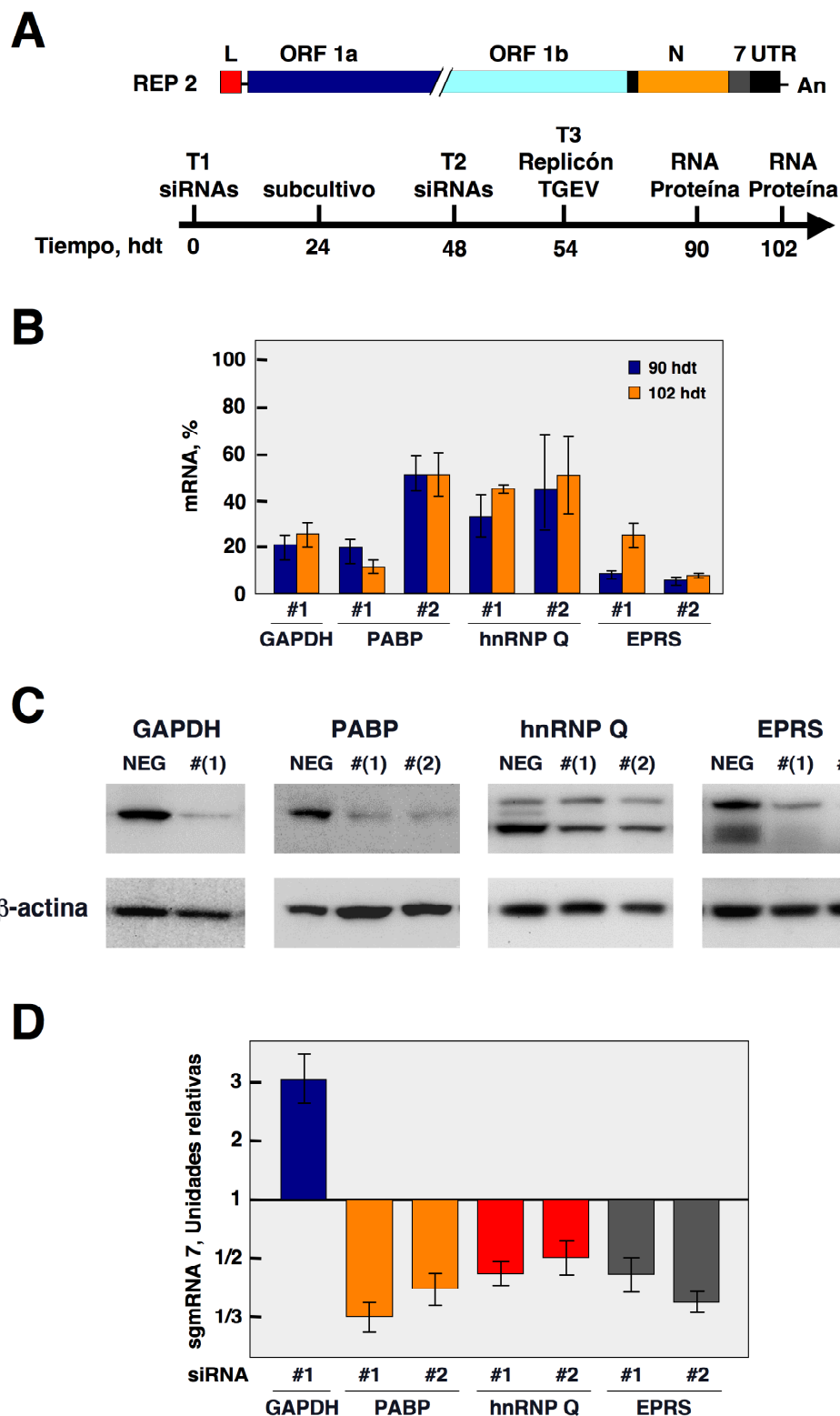
Para llevar a cabo los ensayos de silenciamiento, se seleccionaron las células 293T por su elevada eficiencia de transfección, porque son capaces de soportar la replicación del replicón del TGEV (Almazan y col., 2004) y por la disponibilidad de siRNAs y ensayos de expresión génica pre-diseñados para el análisis de genes humanos. Con el fin de reducir la dosis del siRNA transfectado y los efectos secundarios no deseados en otros genes, se utilizaron siRNAs modificados químicamente (*Silencer selected siRNAs*, Ambion) y se analizaron dos siRNAs por gen (Tabla IX). Inicialmente, se optimizó la transfección de los siRNAs utilizando un siRNA validado frente al gen de la GAPDH marcado con Cy3 (Tabla IX), obteniéndose eficiencias de transfección próximas al 100% (datos no mostrados). Posteriormente, se optimizó la ventana de silenciamiento para el gen GAPDH (control positivo de silenciamiento) y los genes de las proteínas seleccionadas. En las condiciones optimizadas se necesitaron dos transfecciones de los siRNAs para lograr un silenciamiento del mRNA durante al menos 70 h, que permitiese ver un silenciamiento significativo a nivel de proteína en el momento de analizar la actividad del replicón del TGEV.

Una vez optimizadas las condiciones de silenciamiento génico, se seleccionaron las proteínas PABP, hnRNP Q y EPRS para realizar el estudio, ya que mostraron las mejores eficiencias de silenciamiento tanto a nivel de mRNA como de proteína, sin afectar significativamente la viabilidad celular (>95%). Células 293T se transfectaron

dos veces, con un intervalo de tiempo de 48 h, con los siRNAs específicos frente a los genes seleccionados, el siRNA específico de la GAPDH y un siRNA validado irrelevante como control negativo. A las 6 h después de la segunda transfección con los siRNA, las células se transfectaron con el replicón del TGEV. Transcurridas 36 y 48 h después de la transfección con el replicón (90 y 102 h después de la primera transfección con los siRNA, respectivamente) se recogieron muestras, se aisló el RNA y la proteína total, y se evaluó tanto el silenciamiento génico como la actividad del replicón (Fig. 31A).

El silenciamiento de los genes dianas y del control positivo GAPDH se analizó a nivel de mRNA a las 90 y 102 h después de la primera transfección de los siRNAs, mediante Q-RT-PCR utilizando ensayos TaqMan específicos para cada gen (Tabla VII). Se observó una reducción en los niveles de mRNA del 80% para la GAPDH. En el caso de los genes dianas, la reducción en los niveles de mRNA fue dependiente del siRNA utilizado, siendo del 70 al 95% para al menos un siRNA de la PABP y la EPRS, y de alrededor del 60% para los dos siRNAs frente a la hnRNP Q (Fig. 31B). A nivel de proteína, el silenciamiento se analizó a las 102 h después de la primera transfección con los siRNA mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos (Tabla VIII), observándose una reducción en los niveles de proteína del 50% para la hnRNP Q y entre el 65 y el 85% para la GAPDH, PABP y EPRS (Fig. 31C).

Finalmente, la actividad del replicón en las células silenciadas se analizó cuantificando los niveles del sgmRNA 7 viral a las 36 y 48 h después de la transfección del replicón (90 y 102 h después de la primera transfección con los siRNAs) mediante Q-RT-PCR utilizando un ensayo TaqMan específico (Tabla VII). En las células en las cuales se silenciaron los genes PABP, hnRNP Q y EPRS, se observó una reducción significativa y reproducible de dos a tres veces en los niveles del sgmRNA del gen 7 con respecto a los niveles obtenidos en células transfectadas con un siRNA irrelevante validado (Fig. 31D). La reducción de la actividad del replicón correlacionaba estrechamente con la eficiencia de silenciamiento de los diferentes siRNAs para cada gen, tanto a nivel de mRNA como de proteína. Estos datos indicaron que la PABP, hnRNP Q y EPRS tenían un efecto positivo en la síntesis de RNA del TGEV. Curiosamente, en el caso de las células silenciadas para el control positivo de silenciamiento GAPDH, se observó un incremento de tres veces en los niveles del sgmRNA del gen 7 (Fig. 31D), indicando que la GAPDH tenía un efecto negativo en la síntesis de RNA del TGEV.



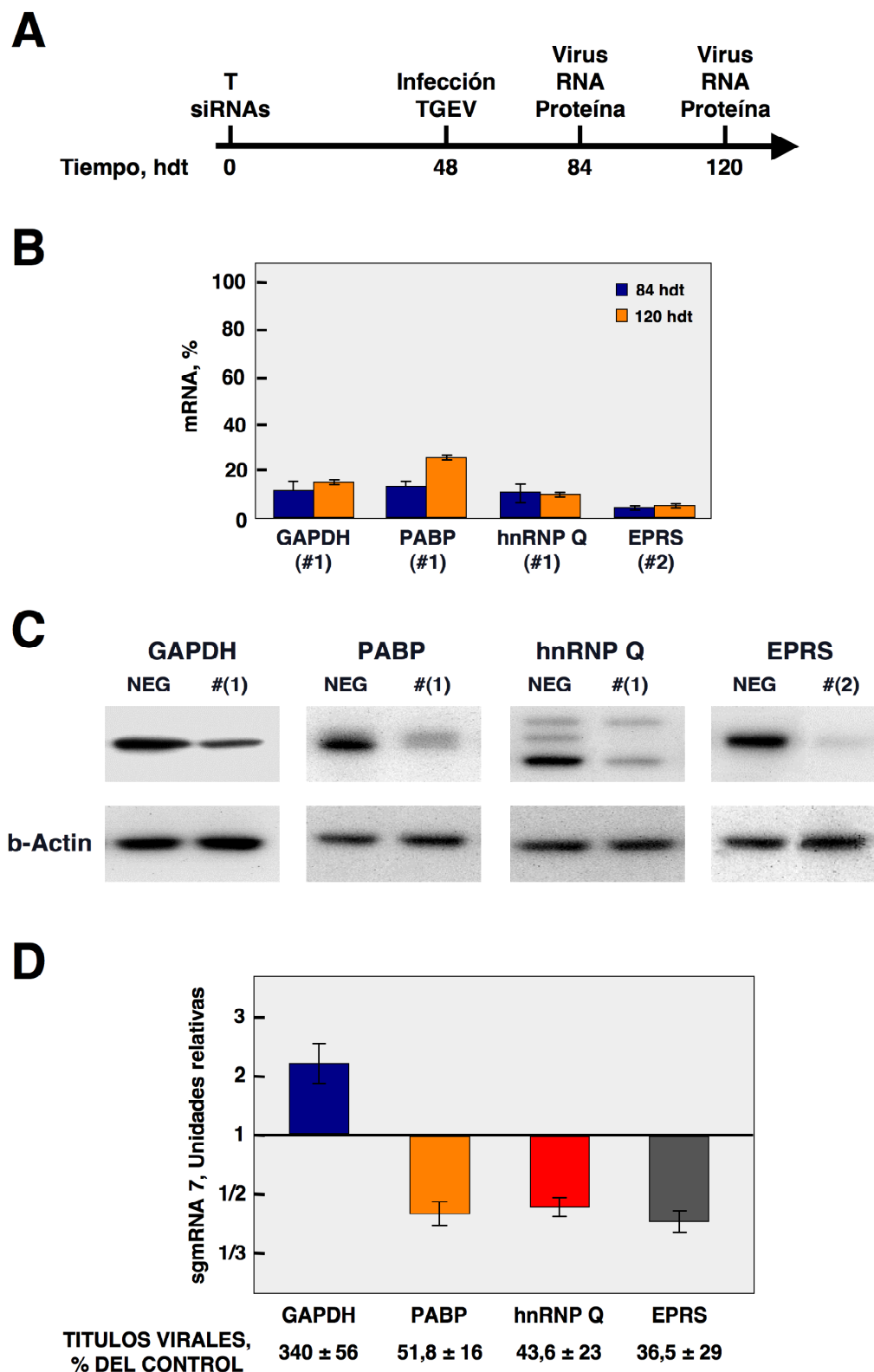
**Figura 31. Efecto del silenciamiento de las proteínas que interaccionan con el extremo 3' del genoma sobre la actividad del replicón del TGEV.** A) Diseño experimental. En la parte superior se muestra la estructura genética del replicón del TGEV (REP 2), donde se indican los genes virales, la secuencia líder (L) y la secuencia 3' UTR (UTR). Debajo del genoma del replicón se muestra un esquema del procedimiento experimental, donde el tiempo hace referencia a las horas después de la primera transfección (hdt) con los siRNAs. Células 293T se transfectaron (T1) con un siRNA específico de la GAPDH como control positivo del silenciamiento, un siRNA validado irrelevante como control negativo y con los siRNAs específicos frente a los genes diana (Tabla IX). A los tiempos indicados, las células se subcultivaron en placas de 96 pocillos, se retransfectaron con los mismos siRNAs (T2), posteriormente se transfectaron con el replicón del TGEV (T3) y finalmente, se tomaron muestras de proteína y RNA total

para evaluar el silenciamiento génico y la actividad del replicón. B) Análisis del silenciamiento génico a nivel de mRNA. El porcentaje del mRNA después del silenciamiento del gen control (GAPDH) y de los genes diana indicados utilizando dos siRNAs diferentes para cada gen (#1 y #2), se cuantificó a los tiempos indicados después de la primera transfección de los siRNAs mediante Q-RT-PCR, en comparación con los niveles de referencia en células transfectadas con un siRNA irrelevante. C) Análisis del silenciamiento génico a nivel de proteína. Los niveles de proteína después del silenciamiento del gen control (GAPDH) y de los genes diana indicados utilizando dos siRNAs diferentes para cada gen (#1 y #2), se cuantificaron a las 102 h después de la primera transfección de los siRNAs mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos (Tabla VIII), en comparación con los niveles de referencia en células transfectadas con un siRNA irrelevante (NEG). Se determinaron los niveles de  $\beta$ -actina como control de carga. D) Actividad del replicón en células silenciadas. La actividad del replicón en las células silenciadas para el gen control (GAPDH) y los genes diana indicados utilizando dos siRNAs diferentes para cada gen (#1 y #2), se evaluó a las 90 y 102 h después de la primera transfección de los siRNAs (36 y 48 h después de la transfección del replicón, respectivamente) mediante la cuantificación por Q-RT-PCR de los niveles del sgRNA del gen 7, los cuales se representan como las veces de cambio con respecto a los niveles de referencia en células transfectadas con un siRNA irrelevante. Solo se representa el tiempo (36 ó 48 h después de la transfección del replicón) donde el efecto sobre la actividad del replicón fue máximo. Los datos representan la media de tres experimentos, indicándose con barras de error las desviaciones estándar.

#### **2.1.2.2. Efecto del silenciamiento de los genes GAPDH, PABP, hnRNP Q y EPRS en la infección por TGEV**

Con el fin de confirmar los datos obtenidos utilizando el replicón del TGEV, se analizó el efecto del silenciamiento de los genes GAPDH, PABP, hnRNP Q y EPRS sobre la infección por TGEV. Para llevar a cabo este estudio, se seleccionó la línea celular humana Huh-7 que es susceptible de ser infectada por el aislado PUR46-C11 del TGEV.

Inicialmente, se optimizó la transfección de los siRNAs y la ventana de silenciamiento para los genes de las proteínas seleccionadas de forma similar a la descrita para las células 293T. En las condiciones optimizadas, una sola transfección de los siRNAs mediante transfección reversa fue suficiente para lograr un silenciamiento significativo a nivel de mRNA (>80%) y proteína (>65%) en el momento de analizar la síntesis de RNA viral y la producción de virus infeccioso (datos no mostrados). Por otra parte, solo el siRNA que presentaba la mayor eficiencia de silenciamiento para cada gen (siRNA 1 para la PABP y hnRNP Q y el siRNA 2 para la EPRS) se seleccionó para realizar el ensayo. Células Huh-7 se transfectaron mediante transfección reversa con los siRNAs específicos de los genes seleccionados y un siRNA validado irrelevante como control negativo (Tabla IX). A las 48 hdt, las células se infectaron con el aislado PUR46-C11 del TGEV a una mdi de 5 UFP/célula y transcurridas 36 y 72 hdi (84 y 120 h después de la transfección con los siRNAs, respectivamente) se recogieron muestras de RNA, proteína total y virus extracelular para evaluar el silenciamiento génico, la síntesis de RNA viral y la producción viral (Fig. 32A).



**Figura 32. Análisis del efecto del silenciamiento de la expresión de las proteínas GAPDH, PABP, hnRNP Q y EPRS en la infección viral.** A) Diseño experimental. Se muestra un esquema del procedimiento experimental, donde el tiempo hace referencia a las horas después de la transfección (hdt) con los siRNAs. Células Huh-7 se transfectaron (T) con un siRNA validado irrelevante como control negativo y con los siRNAs específicos frente a los genes diana (Tabla IX). A las 48 hdt, las células se infectaron con el aislado PUR46-C11 del TGEV y a los tiempos indicados se tomaron muestras para evaluar el silenciamiento génico, la síntesis de RNA viral y la producción viral. B) Análisis del silenciamiento génico a nivel de mRNA. El porcentaje del mRNA después del silenciamiento de los genes diana (se indica el siRNA utilizado para cada gen) se cuantificó a los tiempos indicados mediante

Q-RT-PCR, en comparación con los niveles de referencia en células transfectadas con un siRNA irrelevante. C) Análisis del silenciamiento génico a nivel de proteína. Los niveles de proteína después del silenciamiento de los genes indicados, se cuantificaron a las 120 h después de la transfección de los siRNAs mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos (Tabla VIII), en comparación con los niveles de referencia en células transfectadas con un siRNA irrelevante (NEG). Se determinaron los niveles de  $\beta$ -actina como control de carga. D) Síntesis de RNA viral y producción viral en células silenciadas. La síntesis de RNA viral en las células silenciadas para los genes indicados se evaluó a las 120 h después de la transfección de los siRNAs (72 hdi) mediante la cuantificación por Q-RT-PCR de los niveles del sgRNA del gen 7, los cuales se representan como las veces de cambio con respecto a los niveles de referencia en células transfectadas con un siRNA irrelevante. Los datos representan la media de tres experimentos, indicándose con barras de error las desviaciones estándar.

El silenciamiento a nivel de mRNA de los genes dianas se analizó a las 36 y 72 hdi (84 y 120 h después de la transfección con los siRNAs, respectivamente) mediante Q-RT-PCR utilizando ensayos TaqMan específicos para cada gen (Tabla VII). Se observó una reducción en los niveles de mRNA entre el 85 y el 90% en todos los casos (Fig. 32B). El silenciamiento a nivel de proteína se evaluó a las 72 hdi (120 h después de la transfección con los siRNAs) mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos (Tabla VIII). Se observó una reducción en la expresión superior al 65% para todas las proteínas analizadas (Fig. 32C).

La síntesis de RNA viral se analizó cuantificando los niveles del sgRNA 7 viral a las 36 y 72 hdi mediante Q-RT-PCR utilizando un ensayo TaqMan específico (Tabla VII), detectándose un mayor efecto a las 72 hdi (Fig. 32D). Como en el caso del replicón, se observó una reducción significativa y reproducible de más de dos veces en los niveles del sgRNA 7 cuando se silenció la expresión de los genes PABP, hnRNP Q y EPRS y un incremento de casi tres veces cuando se silenció la GAPDH (Fig. 32D). Finalmente, la producción viral se determinó a las 72 hdi mediante titulación en células ST. En consonancia con los efectos observados en la síntesis del RNA viral, se detectó una reducción en los títulos virales del 36-50% cuando se silenciaron los genes PABP, hnRNP Q y EPRS, y un incremento del 340% cuando se silenció el gen GAPDH (Fig. 41D). En conjunto, estos resultados indicaban que las proteínas celulares PABP, hnRNP Q y EPRS tenían un efecto positivo en la síntesis de RNA viral y en la producción de virus infeccioso, mientras que la GAPDH tenía un efecto negativo.

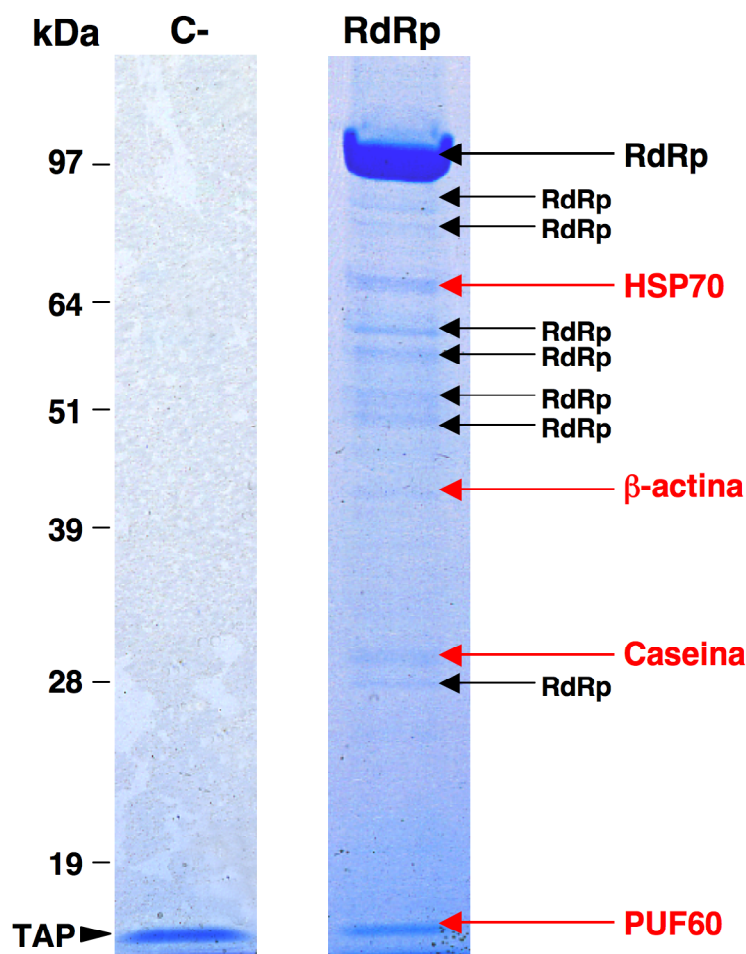
## **2.2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CELULARES QUE INTERACCIONAN CON LA RdRp DEL TGEV**

La RdRp es una proteína clave en la síntesis de RNA viral y el principal componente del CRT. Además de interactuar con proteínas virales, la RdRp posiblemente interactúe con proteínas del hospedador, las cuales podrían modular la actividad y procesividad de la RdRp. Por lo tanto, una aproximación prometedora para identificar factores celulares implicados en la síntesis de RNA de CoV, consiste en la identificación de proteínas celulares que interactúan con la RdRp. Para abordar este objetivo, se han seguido dos aproximaciones complementarias, la purificación y análisis de complejos proteicos de la RdRp utilizando la tecnología del TAP y el sistema de doble híbrido en levaduras.

### **2.2.1. Identificación de proteínas celulares que interactúan con la RdRp mediante la tecnología del TAP**

En este sistema la RdRp se expresa en células eucarióticas fusionada en su extremo C-terminal con el dominio TAP, constituido por el péptido de unión a calmodulina, el sitio de procesamiento para la proteasa TEV y el dominio de unión a IgG de la proteína A. Posteriormente, los complejos proteicos formados con la RdRp se purifican mediante una doble cromatografía de afinidad a IgG y calmodulina. Finalmente, las proteínas que copurifican con la RdRp son identificadas mediante espectrometría de masas (Fig. 11). Para llevar a cabo este tipo de estudios, se seleccionó la línea celular humana 293T, dado que estas células presentan una eficiencia de transfección muy elevada, facilitan la identificación de las proteínas en las bases de datos por ser células humanas y soportan la replicación del TGEV cuando este es introducido en forma de cDNA infeccioso (Almazan y col., 2000). Inicialmente, se optimizó la transfección con fosfato cálcico y se analizó la cinética de expresión de la RdRp en las células transfectadas con el plásmido pcTAP-RdRp (expresa bajo el control del promotor del CMV la RdRp fusionada al dominio TAP), obteniéndose los mayores niveles de expresión a las 48 hdt (datos no mostrados). Una vez optimizadas las condiciones de transfección y expresión, se procedió a la expresión a gran escala de la RdRp fusionada al dominio TAP y a la purificación de los complejos proteicos como se describe en la sección 8.7.2 de Materiales y Métodos. Los complejos proteicos purificados se analizaron por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie (Fig. 33), en paralelo con una muestra control





**Figura 33. Análisis proteómico de las proteínas celulares que copurifican con la RdRp.** Células 293T se transfectaron con el plásmido pcTAP-RdRp (RdRp) o con el plásmido pcTAP vacío (-C), utilizando como agente de transfección el fosfato cálcico. A las 48 hdt, las células se lisaron y los complejos proteicos formados con la RdRp se purificaron mediante una doble cromatografía de afinidad a IgG y calmodulina. Los complejos purificados se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie y las proteínas se identificaron mediante espectrometría de masas. Las proteínas identificadas se indican con flechas y el dominio TAP con una punta de flecha. Los marcadores de masa molecular se indican en la izquierda en kDa.

procedente de células transfectadas con el plásmido vacío que expresaba solo el dominio TAP. Además de la RdRp, se detectaron al menos 11 proteínas que copurificaban con la RdRp, las cuales no estaban presentes en la muestra control. Estas proteínas se recortaron del gel y se identificaron por espectrometría de masas. Además de varios productos de degradación de la RdRp, se identificaron cuatro proteínas celulares (Fig. 33 y Tabla XIII), entre las que se incluían la proteína HSP70 que es una chaperona implicada en la respuesta a estrés, la  $\beta$ -actina, la subunidad  $1\alpha$  de la caseína que está implicada en el transporte de calcio y el factor de *splicing* de 60 kDa PUF60. En todos los casos las proteínas se identificaron de forma reproducible en varios

experimentos con una puntuación estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) asignada por el programa MASCOT (Tabla XIII).

Debido a las importantes funciones biológicas que desempeña el calcio, se llevó a cabo el mismo experimento utilizando como agente de transfección la *Lipofectamina 2000* (Invitrogen). El perfil de proteínas que copurificaban con la RdRp fue el mismo que cuando las células se transfectaron con fosfato cálcico y no se identificó ninguna proteína adicional (datos no mostrados).

**TABLA XIII. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS MEDIANTE LA TECNOLOGÍA DEL TAP**

Nº Acceso	Proteína	Función <sup>(a)</sup>	MM <sup>(b)</sup>	S/SS <sup>(c)</sup>	N <sup>(d)</sup>
gi 2495347	HSP70	Chaperona molecular	71	75/70	2
gi 28336	$\beta$ -actina	Citoesqueleto	42	228/70	2
gi 30794348	Caseína (S1 $\alpha$ )	Fosfoproteína de unión a calcio	25	205/70	2
gi 17298690	PUF60	<i>Splicing</i>	60	76/70	2

(a) Función biológica descrita.

(b) MM, masa molecular en kDa.

(c) Los parámetros de los datos de proteómica se indican como: S, valor asignado por el programa MASCOT; SS, valor a partir del cual la identificación es estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). Las búsquedas se llevaron a cabo en la base de datos del NCBI sin restricciones.

(d) Número de veces que se identificó la proteína.

### 2.1.2. Identificación de proteínas celulares que interaccionan con la RdRp mediante el sistema de doble híbrido en levaduras

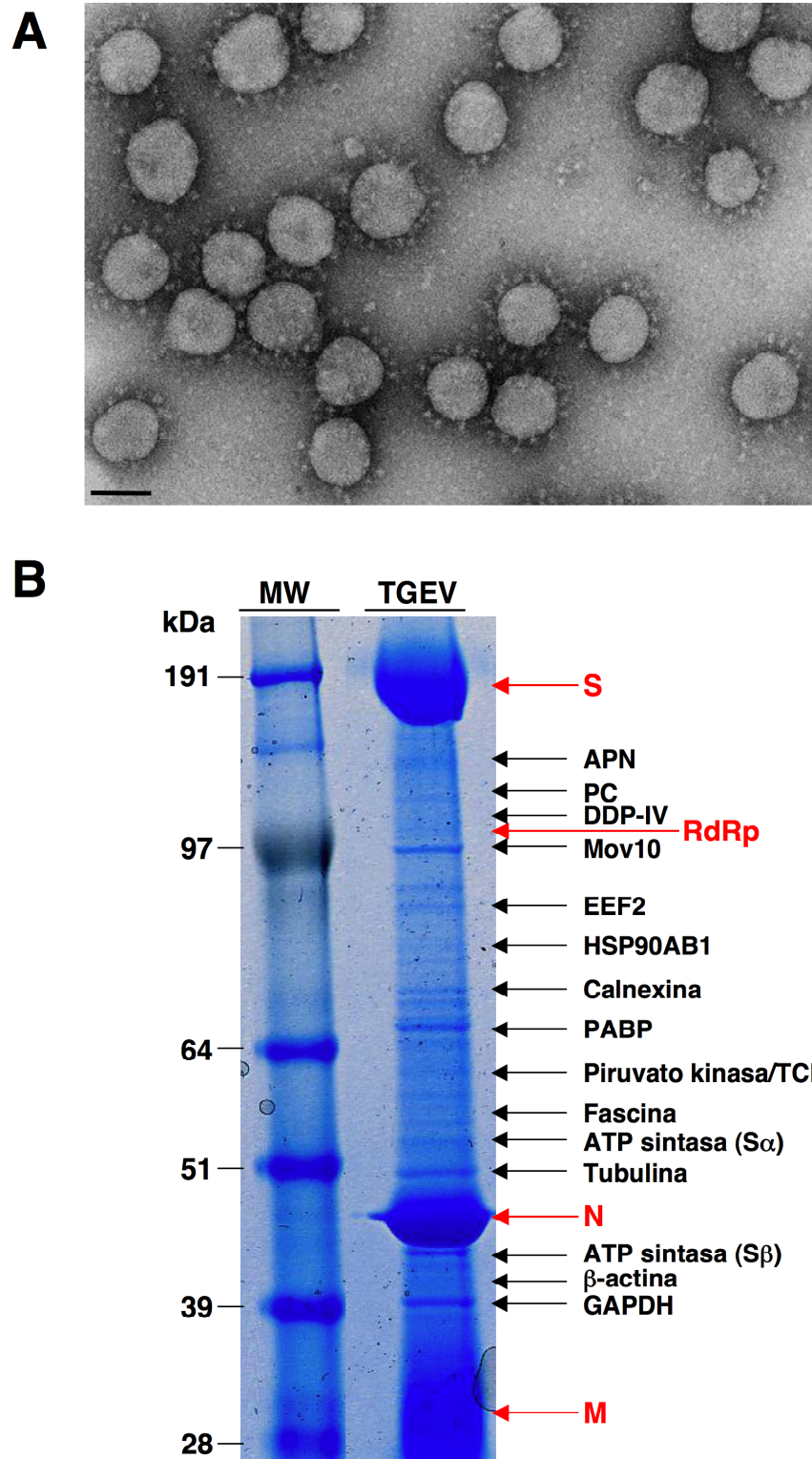
El ensayo de doble híbrido se realizó siguiendo procedimientos estándar (Koegl y Uetz, 2007) utilizando el plásmido pGBT9-RdRp, el cual expresa la RdRp fusionada al dominio de unión del factor de transcripción GAL4, y una librería no redundante y normalizada con más de 10000 secuencias de genes humanos fusionados al dominio de activación del factor de transcripción GAL4 (Lamesch y col., 2007). Se realizaron dos análisis independientes y en ambos casos se identificó el factor de transcripción TRIM27 o RFP (gi|5730009; proteína 27 que contiene un dominio tripartito), el cual está implicado en respuesta antiviral (Ozato y col., 2008; Shimono y col., 2003; Zha y col., 2006). En ambos análisis la proteína se identificó en más de 30 clones positivos con una promiscuidad de 2 (valores superiores a cuatro se consideran falsos positivos). Actualmente, se está estudiando la relevancia funcional de estas proteínas en la síntesis de RNA de CoV mediante ensayos de silenciamiento génico.

### 3. ESTUDIO DE LA ENCAPSIDACIÓN DEL CRT

En el caso de los virus RNA de polaridad negativa, está perfectamente documentado que el CRT es encapsidado en la partícula viral y que este es necesario para iniciar la infección viral. En el caso de los virus RNA de polaridad positiva, se conoce muy poco acerca de este fenómeno y en principio, no sería necesario para iniciar la infección. Sin embargo, sería beneficioso para el virus encapsidar la maquinaria de síntesis de RNA en la partícula viral para poder llevar a cabo una primera amplificación del genoma viral antes de su traducción al inicio de la infección. De este modo se aseguraría la infección al disponer de varias copias del genoma viral. Con el fin de confirmar esta hipótesis se procedió a realizar un estudio detallado de la encapsidación de proteínas virales y celulares del CRT utilizando como modelo de trabajo el TGEV.

#### 3.1. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE PARTÍCULAS VIRALES PURIFICADAS

Como una primera aproximación para identificar proteínas virales y celulares incorporadas en las partículas virales, se llevó a cabo un análisis proteómico de viriones del TGEV altamente purificados. Las partículas virales se purificaron a partir de células porcinas ST infectadas mediante un colchón de sacarosa seguido de un gradiente de sacarosa, según lo descrito previamente (Jimenez y col., 1986). La pureza e integridad de las partículas virales purificadas se analizó mediante microscopía electrónica convencional. Mas del 99% de los viriones presentaban la estructura característica y no se observaron vesículas u otro tipo de contaminantes (Fig. 34A). A continuación se analizó el perfil proteico del virus purificado mediante SDS-PAGE y tinción con Coomassie. Además de las proteínas estructurales S, N y M, se observaron un elevado número de proteínas con diferentes masas moleculares, las cuales se recortaron del gel, se digirieron con tripsina y se analizaron mediante espectrometría de masas (Fig. 34B). El análisis proteómico se realizó con tres purificaciones independientes, identificándose reproduciblemente un total de 16 proteínas celulares con una puntuación estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) asignada por el programa MASCOT y una cobertura de secuencia entre el 45 y el 87% (Tabla XIV). Debido a que la secuencia del genoma de cerdo no está completa en las bases de datos, la mayoría de las proteínas se identificaron por homología con proteínas de otras especies, en especial la humana.



**Figura 34. Identificación de proteínas virales y celulares en los viriones del TGEV.** A) Microscopía electrónica del virus purificado. Los viriones purificados se adsorbieron a rejillas de cobre de microscopía electrónica, se procesaron para tinción negativa con acetato de uranilo al 2% y se examinaron mediante microscopía electrónica. Barra, 100 nm. B) Análisis proteómico de viriones purificados. Las proteínas del virus purificado (30  $\mu$ g) se separaron mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida en gradiente *NuPAGE 4-12% Bis-Tris* (Invitrogen), se tiñeron con azul de Coomassie utilizando el reactivo *Simple Blue SafeStain* (Invitrogen), se recortaron de gel y se analizaron mediante espectrometría de masas. Las proteínas celulares y virales identificadas se indican con flechas negras y rojas, respectivamente. Los marcadores de masa molecular se indican a la izquierda en kDa.

Las proteínas identificadas están implicadas en una variedad de procesos biológicos como traducción, regulación del metabolismo de la glucosa, producción de energía y citoesqueleto, entre otras (Tabla XIV), y en su mayoría también se han identificado en análisis proteómicos realizados con virus purificado del SARS-CoV (Neuman y col., 2008) y del IBV (Kong y col., 2010). Entre las proteínas identificadas cabe destacar la GAPDH y la PABP (Fig. 34B y Tabla XIV), las cuales están implicadas en la síntesis de RNA del TGEV (apartado 2.1 de Resultados).

**TABLA XIV. PROTEÍNAS CELULARES IDENTIFICADAS EN VIRIONES PURIFICADOS DEL TGEV**

Nº Acceso	Proteína	Función <sup>(a)</sup>	MM <sup>(b)</sup>	S/SS <sup>(c)</sup>
gi 47523628	Alanina aminopeptidasa de membrana (APN)	Receptor celular del TGEV	108	155/71
gi 47523756	Piruvato carboxilasa (PC)	Metabolismo de la glucosa	129	96/71
gi 47523582	Dipeptidilpeptidasa IV (DDP-IV)	Adhesión celular	88	133/71
gi 115497510	Mov10	Helicasa de RNA	114	321/71
gi 115497900	EEF2	Traducción	95	392/71
gi 39644662	HSP90AB1	Chaperona molecular	75	248/71
gi 157785567	Calnexina	Chaperona molecular	68	138/71
gi 693937	PABP	Traducción	58	310/71
gi 194038726	Piruvato kinasa 3	Metabolismo de la glucosa	58	353/71
gi 214010129	TCP1	Chaperona de actina y tubulina	59	132/71
gi 225382133	Fascina	Citoesqueleto	55	209/71
gi 6680748	Subunidad $\alpha$ de la ATP sintasa mitocondrial	Producción de energía	60	168/71
gi 7106439	Tubulina	Citoesqueleto	50	460/71
gi 194037554	Subunidad $\beta$ de la ATP sintasa mitocondrial	Producción de energía	56	101/71
gi 62897625	$\beta$ -actina	Citoesqueleto	42	124/71
gi 229279	GAPDH	Metabolismo de la glucosa	36	398/71

(a) Función biológica descrita.

(b) MM, masa molecular en kDa.

(c) Los parámetros de los datos de proteómica se indican como: S, valor asignado por el programa MASCOT; SS, valor a partir del cual la identificación es estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). Las búsquedas se llevaron a cabo en la base de datos del NCBI sin restricciones.

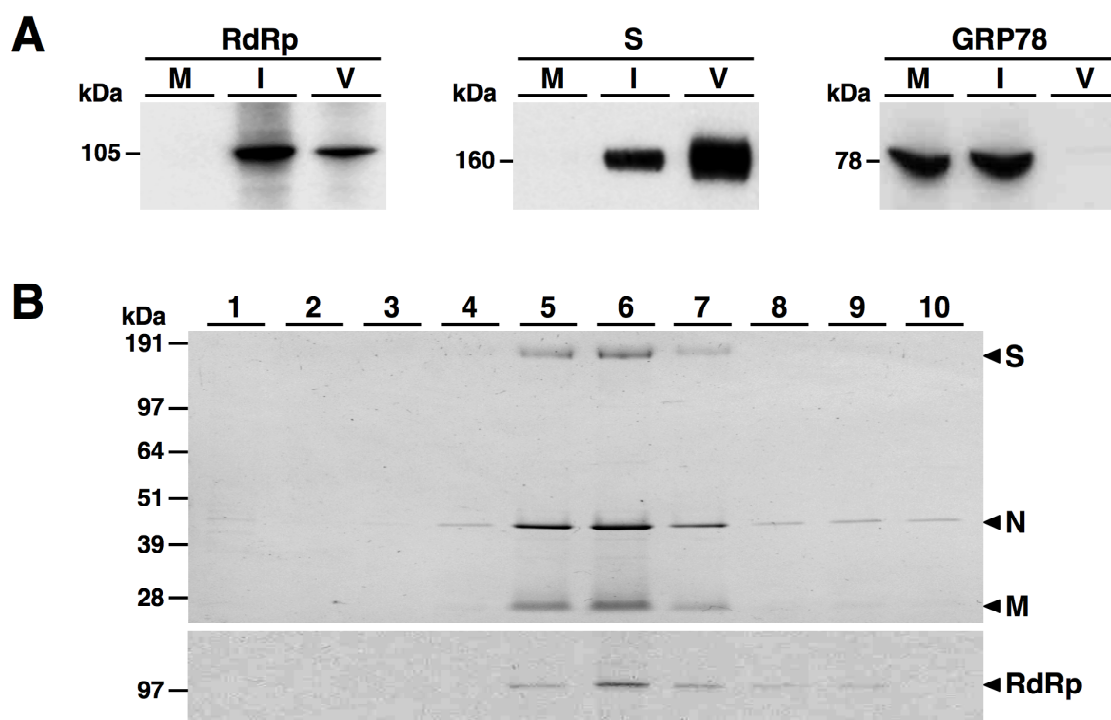
Además de las proteínas celulares, se identificó reproduciblemente la RdRp viral, sugiriendo que la RdRp se incorporaba en las partículas virales (Fig. 34B). También se identificaron algunos péptidos correspondientes a las nsps 2, 3, 7, 9, 13 (Helicasa), 14 (ExoN), 15 (NendoU) y 16 (2'-O-MT), aunque en todos los casos las identificaciones se restringieron a una base de datos específica de las proteínas estructurales y no estructurales del TGEV y la puntuación asignada por el programa MASCOT estaba en el límite para ser considerada estadísticamente significativa (datos no mostrados).

### 3.2. ESTUDIO DE LA ENCAPSIDACIÓN DE LA RdRp

Con el fin de confirmar los datos de proteómica que sugerían que la RdRp se encapsidaba en los viriones, la presencia de la RdRp en las partículas virales se analizó mediante *Western blot*, inmunofluorescencia e inmunomicroscopía electrónica.

#### 3.2.1. Identificación de la RdRp en partículas virales mediante *Western blot*

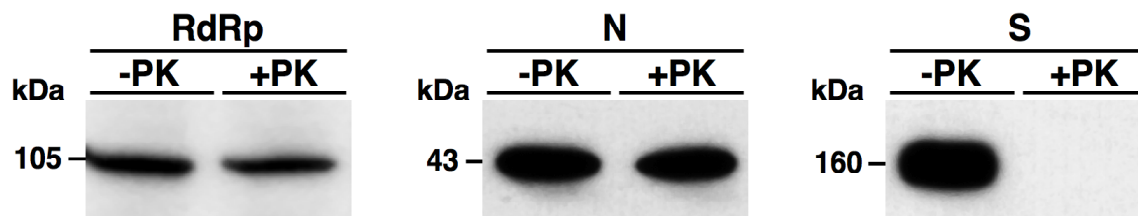
La presencia de la RdRp en los viriones se estudió inicialmente mediante *Western blot*. Con este fin, las proteínas correspondientes a 10 µg de viriones purificados del TGEV se separaron por SDS-PAGE en paralelo con extractos de células ST no infectadas o infectadas a una mdi de 5 UFP/célula (12 hdi), y se analizaron por *Western blot* utilizando el Acm 4D10 específico de la RdRp, el Acm 5BH1 específico para la proteína S como control positivo y un Acp frente al marcador de retículo endoplasmático GRP78 como control negativo (Tabla VIII). De forma similar a la proteína S, la RdRp se detectó tanto en células infectadas como en el virus purificado, mientras que la GRP78 se detectó en células no infectadas e infectadas pero no en virus purificado (Fig. 35A), indicando que la RdRp estaba presente en los viriones purificados. Con el fin de descartar que la RdRp fuese un contaminante, se evaluó su presencia a lo largo del proceso de purificación del virus mediante *Western blot*. La RdRp se detectó exclusivamente en las fracciones del gradiente de sacarosa que contenían mayoritariamente los viriones (Fig. 35B), indicando que la RdRp copurificaba con las partículas virales y por lo tanto no era un contaminante arrastrado durante la purificación del virus.



**Figura 35. Identificación de la RdRp en viriones purificados del TGEV.** A) *Western blot* de viriones purificados. Extractos de células ST no infectadas (M) o infectadas con TGEV (I) se separaron mediante SDS-PAGE (*NuPAGE 4-12% Bis-Tris*) junto con 10 µg de virus purificado y se analizaron mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos frente a las proteínas RdRp, S y GRP78 (Tabla VIII). Las masas moleculares de las proteínas se indican en kDa a la izquierda de cada panel. B) Análisis mediante *Western blot* de la presencia de la RdRp durante el proceso de purificación del virus. El gradiente de sacarosa utilizado para purificar el virus se fraccionó (1-10) desde el fondo del tubo y las fracciones recogidas se analizaron mediante SDS-PAGE (*NuPAGE 4-12% Bis-Tris*) y tinción con azul de Coomassie (panel superior) o mediante *Western blot* utilizando el Acm 4D10 de la RdRp (panel inferior). Las proteínas virales S, N, M y RdRp se indican a la derecha con puntas de flecha y los marcadores de masa molecular en kDa a la izquierda.

Posteriormente, para descartar la posibilidad de que la RdRp fuera un contaminante asociado a la cara externa de la envuelta viral, su presencia en viriones tratados con proteasa K se analizó mediante *Western blot* utilizando el Acm 4D10 (Tabla VIII). En paralelo, se analizó la presencia de las proteínas N y S utilizando anticuerpos específicos (Tabla VIII), como controles de proteína interna y de la superficie del virión, respectivamente (Fig. 36). El tratamiento con proteasa K debería degradar las proteínas localizadas fuera de la partícula viral o expuestas en la superficie del virión, como es el caso de la proteína S, mientras que las proteínas localizadas en el interior de la partícula viral, como la proteína N, deberían estar protegidas. Al igual que la proteína N, mas del 75% de la RdRp presente en el virus purificado se detectó después del tratamiento con proteasa K, mientras que la proteína S se degradó completamente (Fig. 36). La reducción en los niveles de las proteínas N y RdRp después del tratamiento con proteasa K, se debe muy posiblemente a la degradación de estas proteínas en virus rotos

y por lo tanto accesibles a la acción de la proteasa. Estos datos confirmaban que la RdRp, al igual que la proteína N, se localizaba en el interior de las partículas virales.

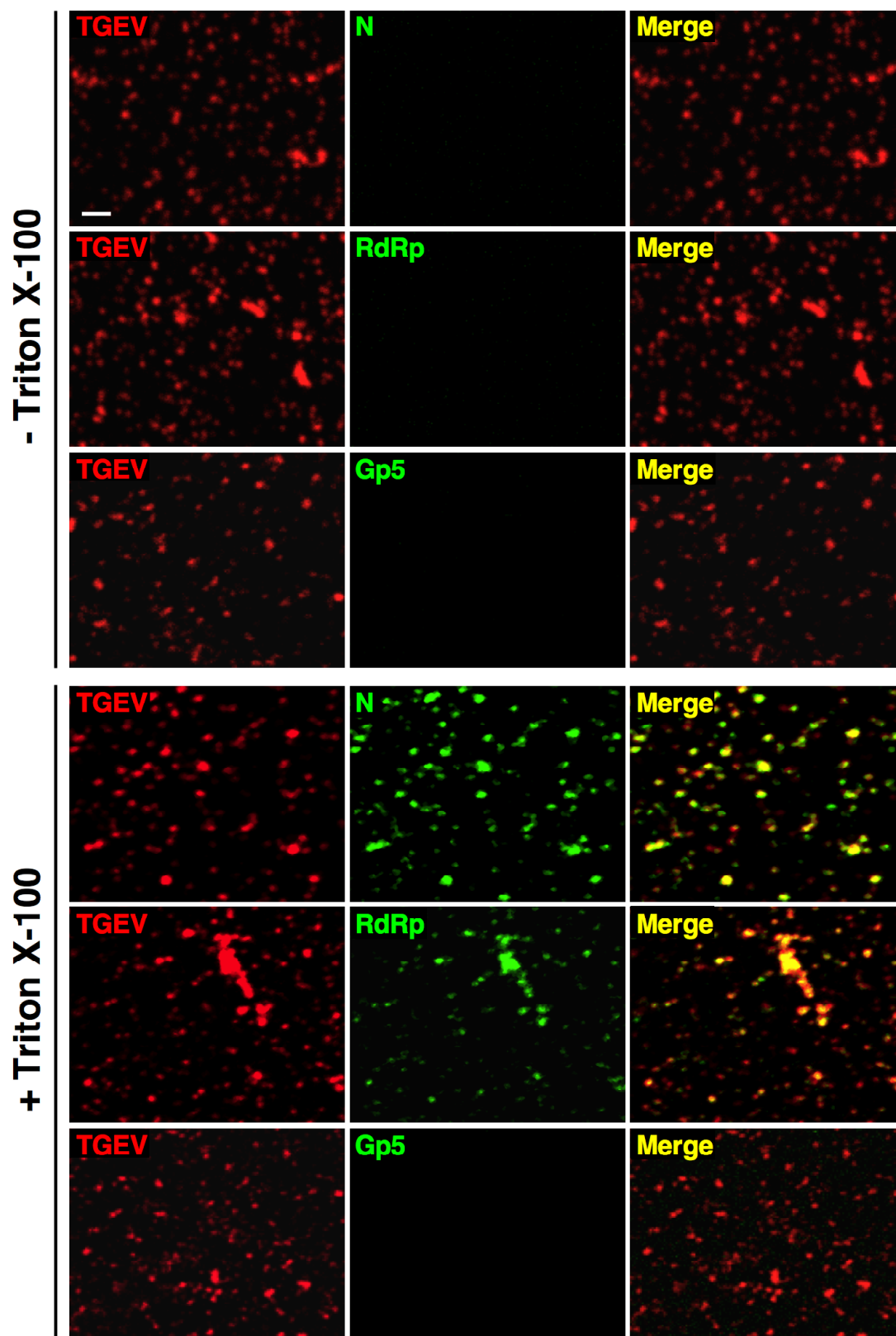


**Figura 36. Análisis de la RdRp en viriones purificados del TGEV tratados con proteasa K.** Viriones purificados (10  $\mu$ g) se trataron (+PK) o no se trataron (-PK) con proteasa K y la presencia de las proteínas virales RdRp, N y S se analizó mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos (Tabla VIII). La masa molecular de las proteínas se indica a la izquierda en kDa.

### 3.2.2. Identificación de la RdRp en partículas virales mediante inmunofluorescencia

Para confirmar la incorporación de la RdRp en las partículas virales, la presencia de la RdRp se analizó en virus purificado nativo o permeabilizado con Triton X-100 mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal, utilizando el Acm 2C11 de la RdRp (Fig. 37). En paralelo, los viriones se analizaron con un Acp frente al TGEV que reconoce las proteínas estructurales S, N y M (Risco y col., 1996) (Tabla VIII) como control de la identidad del virus, con el Acm 3DC10 frente a la proteína N (Martín-Alonso y col., 1992) como control de una proteína interna del virus y con un anticuerpo irrelevante frente a la GP5 del PRRSV (Rodríguez y col., 2001) como control negativo (Tabla VIII). Tanto la RdRp como la proteína N se detectaron exclusivamente en los viriones permeabilizados, donde colocalizaban con las partículas virales detectadas con el Acp frente al TGEV (Fig. 37), confirmando que la RdRp se encontraba en el interior de las partículas virales, al igual que la proteína estructural N.

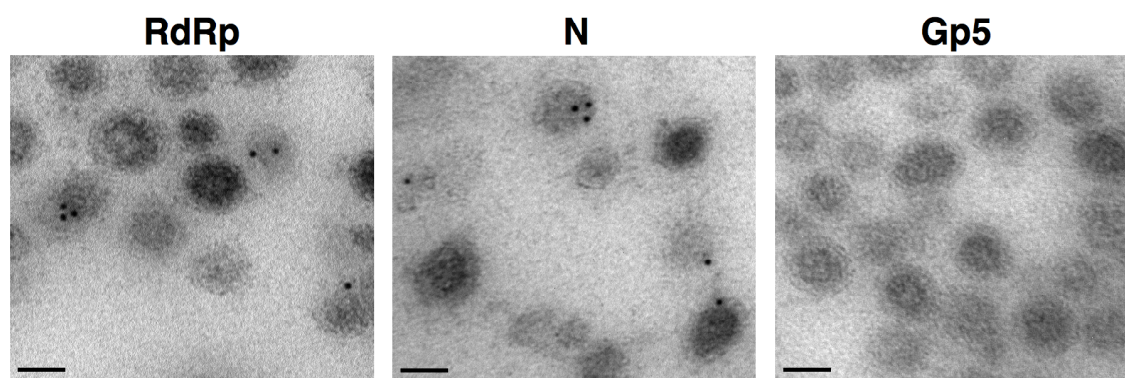




**Figura 37. Análisis de la RdRp en viriones purificados del TGEV mediante inmunofluorescencia.** Viriones del TGEV no permeabilizados o permeabilizados con Tritón X-100 al 0.5% se analizaron mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal, utilizando anticuerpos específicos frente al TGEV (rojo), la RdRp (verde), la proteína N (verde) y la proteína GP5 del PRRSV (verde). Las colocalizaciones (merge) se muestran en amarillo. Barra, 2µm.

### 3.2.3. Identificación de la RdRp en partículas virales mediante inmunomicroscopía electrónica

Finalmente, la presencia de la RdRp en el interior de los viriones del TGEV se analizó mediante inmunomicroscopía electrónica de secciones ultrafinas (90 nm) de viriones purificados, utilizando el Acm 2C11 purificado específico para la RdRp y un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a partículas de oro de 5 nm de diámetro (Tabla VIII). En paralelo, los viriones se analizaron con el Acm 3DC10 específico de la proteína estructural N como control positivo y con un anticuerpo irrelevante frente a la proteína GP5 del PRRSV como control negativo (Tabla VIII). Se observó un claro marcaje en los viriones analizados con los Acms frente a la RdRp y la proteína N, mientras que no se detectaron partículas de oro en los viriones analizados con el anticuerpo irrelevante (Fig. 38). Por otra parte, cuando se analizó la proporción de virus marcados con partículas de oro, esta resultó ser del 9 y el 10% para la RdRp y la N, respectivamente. El porcentaje de virus marcados está en concordancia con la proporción esperada de viriones accesibles a los anticuerpos en una sección de 90 nm, que es aproximadamente el tamaño de la partícula viral. Finalmente, un examen detallado de la distribución de las partículas de oro en los viriones marcados con los Acms frente a las proteínas N y RdRp, mostró que la mayoría se localizaban claramente en el interior de la partícula viral (Tabla XV). En su conjunto, todos estos datos indican que la RdRp es incorporada en el interior de las partículas virales.



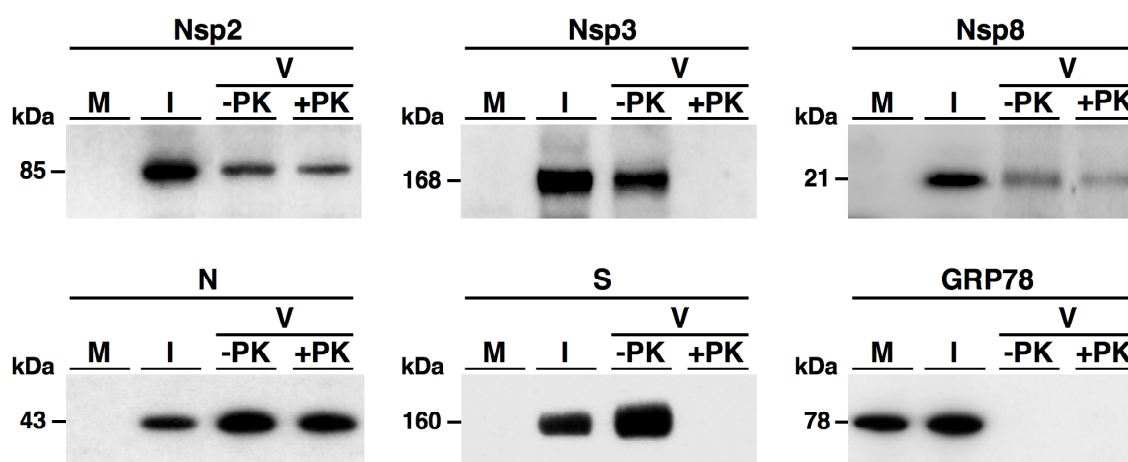
**Figura 38. Análisis de la RdRp en viriones purificados del TGEV mediante inmunomicroscopía electrónica.** Secciones ultrafinas de viriones purificados del TGEV se analizaron mediante inmunomicroscopía electrónica utilizando anticuerpos específicos frente a la RdRp, la proteína estructural N del TGEV y la proteína GP5 del PRRSV (Tabla VIII). Barras, 50 nm.

### 3.3. ESTUDIO DE LA ENCAPSIDACIÓN DE LAS NSPs 2, 3 y 8

Una vez confirmada la encapsidación de la RdRp, se analizó la presencia en las partículas virales de otras proteínas de la replicasa viral implicadas en la síntesis de RNA de CoV. Para llevar a cabo este estudio, se seleccionaron las nsps 2, 3 y 8, dado que se disponía de Acps específicos que reconocían las proteínas tanto por *Western blot* como por inmunofluorescencia.

#### 3.3.1. Identificación de las nsps 2, 3 y 8 en partículas virales mediante *Western blot*

Inicialmente, la presencia en las partículas virales de las nsps 2, 3 y 8 se estudió mediante *Western blot*. Con este fin, extractos de células ST no infectadas o infectadas a una mdi de 5 UFP/célula (12 hdi) se separaron mediante SDS-PAGE junto con 10 µg de viriones purificados del TGEV no tratados o tratados con proteasa K y se analizaron por *Western blot* utilizando los Acps específicos de las nsps 2, 3 y 8 (Tabla VIII). En paralelo, el ensayo se realizó con Acms específicos para las proteínas estructurales N y S, como controles positivos de proteínas internas y de la envuelta del virus, respectivamente, y con un Acp frente al marcador de retículo endoplasmático GRP78 como control negativo (Tabla VIII). De forma similar a las proteínas estructurales S y N, las nsps 2, 3 y 8 se detectaron tanto en células infectadas como en los viriones purificados, mientras que la GRP78 no se detectó en virus purificado (Fig. 39).

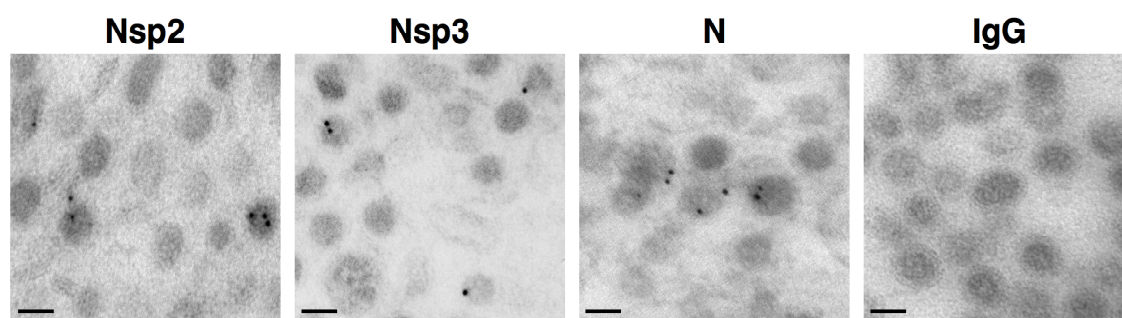


**Figura 39. Análisis de la presencia de las nsps 2, 3 y 8 en viriones purificados del TGEV mediante *Western blot*.** Extractos de células ST no infectadas (M) o infectadas con TGEV (I) se separaron mediante SDS-PAGE (*NuPAGE 4-12% Bis-Tris*) junto con 10 µg de virus purificado tratado (+PK) o no tratado (-PK) con proteasa K y se analizaron mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos (Tabla VIII) frente a las proteínas indicadas. Las masas moleculares de las proteínas se indican en kDa a la izquierda de cada panel.

Después del tratamiento de los viriones purificados con proteasa K, no se observó una reducción significativa en los niveles de las proteínas N, nsp2 y nsp8, mientras que no se detectaron las proteínas S y nsp3 (Fig. 39). Estos datos sugerían que las nsps 2 y 8, al igual que la RdRp, se localizaban en el interior de la partícula viral y que la nsp3 era un contaminante del proceso de purificación o bien una proteína de la envuelta viral como la proteína S.

### 3.3.2. Identificación de las nsps 2, 3 y 8 en partículas virales mediante inmunomicroscopía electrónica

Con el fin de confirmar la encapsidación de las nsps 2, 3 y 8, su presencia en las partículas virales se analizó mediante inmunomicroscopía electrónica de secciones ultrafinas de viriones purificados utilizando Acps específicos y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a partículas de oro de 5 nm de diámetro (Tabla VIII), siguiendo el procedimiento descrito para la RdRp. En paralelo, los viriones se analizaron con el Acm 3DC10 específico de la proteína estructural N como control positivo y con un anticuerpo irrelevante como control negativo (Tabla VIII). Desafortunadamente, el Acp específico para la nsp8 no funcionó en esta técnica. Sin embargo, se observó un claro marcaje en los viriones analizados con los anticuerpos específicos frente a la proteína N y las nsps 2 y 3 (Fig. 40). Por otra parte, tanto la proporción de virus marcados con partículas de oro (8.3% para la nsp2 y 8.5% para la nsp3) como la distribución de las mismas dentro y fuera de los viriones fue muy similar



**Figura 40. Análisis de la presencia de las nsps 2 y 3 en viriones purificados del TGEV mediante inmunomicroscopía electrónica.** Secciones ultrafinas de viriones purificados del TGEV se analizaron mediante inmunomicroscopía electrónica utilizando anticuerpos específicos (Tabla VIII) frente a las proteínas indicadas, así como un anticuerpo irrelevante como control negativo (IgG). Barras, 50 nm.

a la observada para la RdRp o la N (Tabla XV). En conjunto, estos datos indicaban que la nsp2 y posiblemente la nsp8 se incorporan en el interior de la partícula viral y que probablemente, la nsp3 se encuentre en la envuelta viral exponiendo hacia el exterior su extremo N-terminal, que es el reconocido por el Acp.

**TABLA XV. DISTRIBUCIÓN DE PARTÍCULAS DE ORO EN VIRIONES PURIFICADOS DEL TGEV**

Marcaje	-C <sup>(a)</sup>	RdRp	Nsp2	Nsp3	N	PABP	GAPDH
Dentro	0	264 (65.2)	252 (63.6)	232 (59.5)	260 (61.3)	229 (55)	244 (59.4)
Borde	0	54 (13.3)	48 (12.2)	68 (17.4)	48 (11.3)	74 (17.7)	76 (18.5)
Fuera	32 (100)	87 (21.5)	96 (24.2)	90 (23.1)	116 (27.4)	114 (27.3)	91 (22.1)
Total	32 (100)	405 (100)	396 (100)	390 (100)	424 (100)	417 (100)	411 (100)

En la tabla se indica el número y porcentaje (en paréntesis) de la distribución de las partículas de oro.

(a) -C: Anticuerpo irrelevante.

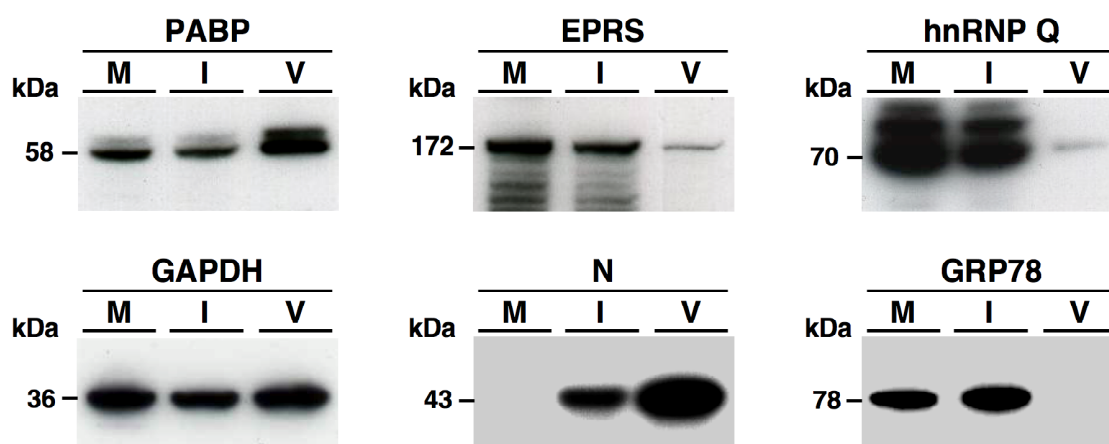
### 3.4. ESTUDIO DE LA ENCAPSIDACIÓN DE PROTEÍNAS CELULARES IMPLICADAS EN LA SÍNTESIS DE RNA DE CoV

Dado que la partícula viral incorpora en su interior componentes virales del CRT, se estudió la posibilidad de que también se encapsidasen específicamente proteínas celulares que estuviesen implicadas en la síntesis de RNA de CoV. En base a los estudios funcionales (Fig. 31 y 32) y el análisis proteómico de las partículas virales purificadas (Fig. 34 y Tabla XIV) mostrados en esta tesis, se seleccionaron las proteínas celulares GAPDH, PABP, hnRNP Q y EPRS para llevar a cabo este estudio.

#### 3.4.1. Identificación de las proteínas celulares GAPDH, PABP, hnRNP Q y EPRS en partículas virales mediante *Western blot*

En una primera aproximación, se analizó la presencia de las proteínas celulares GAPDH, PABP, hnRNP Q y EPRS en la partícula viral mediante *Western blot*. Para ello, 10 µg de viriones purificados del TGEV, junto con extractos de células ST no infectadas o infectadas a una mdi de 5 UFP/célula (12 hdi), se separaron por SDS-PAGE y se analizaron mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos para las proteínas celulares, el Acm 3DC10 específico para la proteína estructural N como control positivo y un Acp frente al marcador de retículo endoplasmático GRP78 como control negativo (Tabla VIII). De forma similar a la proteína estructural N, las cuatro

proteínas celulares se detectaron claramente en los viriones purificados (Fig. 41), siendo mas abundantes la GAPDH y la PABP, las cuales habían sido previamente identificadas en el análisis proteómico de las partículas virales purificadas (Fig. 34B). Estos datos indicaban que las proteínas celulares GAPDH, PABP, hnRNP Q y EPRS estaban presentes en los viriones purificados.



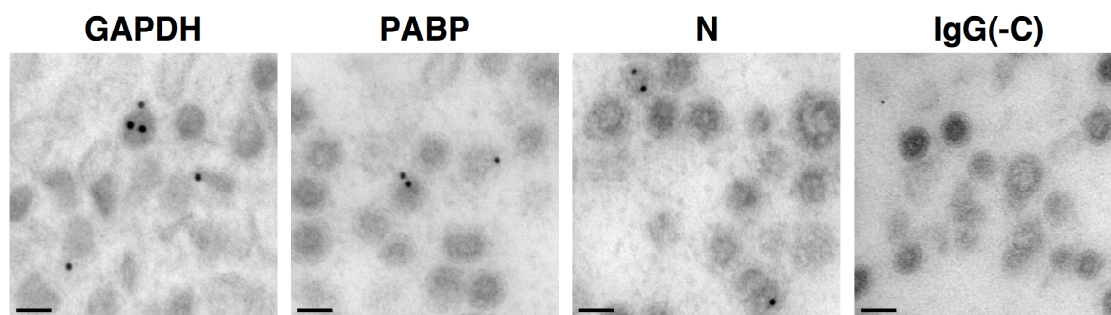
**Figura 41.** Análisis de la presencia de las proteínas celulares GAPDH, PABP, hnRNP Q y EPRS en viriones purificados del TGEV mediante *Western blot*. Extractos de células ST no infectadas (M) o infectadas con TGEV (I) se separaron mediante SDS-PAGE (*NuPAGE 4-12% Bis-Tris*), junto con 10 µg de virus purificado y se analizaron mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos (Tabla VIII) frente a las proteínas indicadas. Las masas moleculares de las proteínas se indican en kDa a la izquierda de cada panel.

### 3.4.2. Identificación de las proteínas celulares GAPDH, PABP, hnRNP Q y EPRS en partículas virales mediante inmunomicroscopía electrónica

Para confirmar la encapsidación de las proteínas celulares GAPDH, PABP, hnRNP Q y EPRS, su presencia en las partículas virales se analizó mediante inmunomicroscopía electrónica de secciones ultrafinas de viriones purificados, utilizando anticuerpos específicos y un anticuerpo secundario acoplado a partículas de oro de 5 nm de diámetro (Tabla VIII). En paralelo, los viriones se analizaron con el Acm 3DC10 específico de la proteína estructural N como control positivo y con un anticuerpo irrelevante como control negativo (Tabla VIII). Desafortunadamente, los anticuerpos utilizados para detectar las proteínas hnRNP Q y EPRS no funcionaron en esta técnica. Sin embargo, se observó un claro marcaje de los viriones analizados con los anticuerpos específicos frente a las proteínas GAPDH y PABP (Fig. 42), siendo la proporción de virus marcados (8.3% para la GAPDH y 8.5% para la PABP) y la distribución de las partículas de oro dentro y fuera de los viriones muy similar a la



observada para la proteína estructural N, la RdRp y las nsps 2 y 3 (Tabla XV). En conjunto, estos datos indican que la GAPDH y la PABP y muy posiblemente la hnRNP Q y la EPRS se incorporan en el interior de la partícula viral junto con la RdRp y el resto de nsps analizadas.



**Figura 42. Análisis de la presencia de las proteínas celulares GAPDH, PABP, hnRNP Q y EPRS en viriones purificados del TGEV mediante inmunomicroscopía electrónica.** Secciones ultrafinas de viriones purificados del TGEV se analizaron mediante inmunomicroscopía electrónica utilizando anticuerpos específicos (Tabla VIII) frente a las proteínas indicadas, así como un anticuerpo irrelevante como control negativo (IgG). Barras, 50 nm.

### 3.5. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS COMPONENTES DEL CRT ENCAPSIDADOS

Con el fin de estudiar si el CRT encapsidado era funcional, se analizó la actividad RdRp en viriones purificados y permeabilizados con Triton X-100 (apartado 14 de Materiales y Métodos). Dado que en el virión se encuentra la nsp8 (primasa) y el genoma viral, que puede servir de molde, los primeros ensayos de actividad se realizaron en ausencia de molde exógeno y de iniciador. En paralelo, el ensayo se realizó con la RdRp purificada del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (Vazquez y col., 1998), como control positivo. A diferencia del control positivo, en las condiciones ensayadas no se detectó actividad RdRp en los viriones purificados del TGEV (datos no mostrados). Posteriormente, el ensayo se realizó utilizando un molde de poliA, el iniciador OligoU<sub>16</sub> o ambos. Solamente en el caso en el que se añadió a la mezcla de reacción el molde exógeno y el iniciador, se detectó una actividad RdRp en los viriones del TGEV, si bien los valores de actividad obtenidos eran de solo dos veces con respecto al fondo (datos no mostrados). Una posible explicación de la baja actividad observada, podría ser que al tratar los viriones con Triton X-100 el CRT encapsidado se esté desensamblando y por

lo tanto inactivándose. Con el fin de analizar esta posibilidad, se están llevando a cabo diferentes ensayos utilizando otros agentes de permeabilización.



## **VII. DISCUSIÓN**

Esta tesis se ha centrado en el estudio de proteínas virales y celulares implicadas en la síntesis de RNA de CoVs utilizando como modelos de trabajo los CoVs TGEV y SARS-CoV, pertenecientes a los géneros  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente.

La identificación y caracterización de proteínas virales implicadas en la síntesis de RNA de CoVs se ha realizado utilizando un replicón del SARS-CoV y anticuerpos específicos frente a diversas proteínas de la replicasa viral. Estos estudios han demostrado que las enzimas implicadas en el metabolismo del RNA, ExoN, NendoU y 2'-O-MT (nsps 14, 15 y 16, respectivamente), son esenciales para la síntesis eficiente del RNA de CoVs y que las nsps 2, 3, 5 y 8 colocalizan con la RdRp en los sitios de síntesis del RNA viral y muy posiblemente formen parte del CRT.

La identificación de proteínas celulares implicadas en la replicación de CoVs se ha realizado en base a su interacción con los extremos del genoma o con la RdRp viral. Entre las proteínas identificadas, se ha determinado un papel funcional en la síntesis de RNA de CoV para las proteínas celulares GAPDH, hnRNP Q, PABP y EPRS, utilizando la tecnología de siRNAs.

Finalmente, se ha estudiado la presencia en la partícula viral de proteínas virales y celulares implicadas en la síntesis del RNA viral, determinándose por primera vez en un virus RNA de cadena positiva la encapsidación de determinados componentes virales y celulares del CRT.

## 1. ESTUDIO DE PROTEÍNAS VIRALES IMPLICADAS EN LA REPLICACIÓN DE CORONAVIRUS

La reciente construcción de clones infectivos (Almazan y col., 2000; Bálint y col., 2012; Casais y col., 2001; Donaldson y col., 2008; St-Jean y col., 2006; Thiel y col., 2001a; Youn y col., 2005; Yount y col., 2000; Yount y col., 2003; Yount y col., 2002) y replicones (Almazan y col., 2004; Thiel y col., 2001b; Thiel y col., 2003b) de CoV ha supuesto un gran avance en el estudio de la biología molecular de los CoVs. Durante mucho tiempo la generación de clones infectivos y replicones de CoV fue infructuosa debido al enorme tamaño del genoma y a la inestabilidad en bacterias de ciertas secuencias del gen de la replicasa. Estos problemas han sido resueltos aplicando diferentes estrategias como el uso de BACs (Almazan y col., 2000; Bálint y col., 2012; St-Jean y col., 2006), la ligación *in vitro* de fragmentos de cDNA (Yount y col., 2000; Yount y col., 2003; Yount y col., 2002) y el uso del virus vaccinia como vector para la

propagación de cDNAs de CoV (Casais y col., 2001; Coley y col., 2005; Thiel y col., 2001a). Entre estas aproximaciones, el uso de BACs presenta varias ventajas. Así, permite el mantenimiento estable en bacterias de fragmentos de DNA de hasta 300 kb, su manipulación es similar a la de un plásmido convencional y permite la expresión intracelular del cDNA infeccioso o replicón sin la necesidad de una etapa previa de transcripción *in vitro*.

En esta tesis se describe la generación del primer replicón del SARS-CoV, ensamblado en un BAC bajo el control del promotor del CMV (Fig. 12). En este sistema, el RNA viral se expresa en el núcleo por la RNA polimerasa II y posteriormente se transloca al citoplasma donde es replicado por la replicasa viral. El replicón generado es funcional tanto a nivel de replicación como de transcripción (Fig. 13) y es completamente estable durante su amplificación en *E. coli*.

La disponibilidad de un replicón funcional permite abordar aspectos básicos de la biología de los CoVs, como es la identificación de proteínas virales implicadas en la replicación del genoma viral. Con este objetivo se ha estudiado el papel en la síntesis de RNA de CoV de las enzimas de procesamiento de RNA ExoN, NendoU y 2'-O-MT (Snijder y col., 2003), usando el replicón generado. En una primera aproximación, se deletaron las secuencias conservadas que contienen el centro catalítico de cada enzima. Estas deletaciones afectaron a la actividad del replicón tanto a nivel de transcripción como de replicación. El mismo efecto se observó cuando en lugar de deletaciones se introdujeron mutaciones puntuales en residuos críticos para la actividad de cada una de las enzimas, demostrando que el defecto en la síntesis de RNA era debido a la falta de actividad de estas tres enzimas (Fig. 15) y no una consecuencia de un posible efecto de las deletaciones introducidas sobre el procesamiento proteolítico de la poliproteína pp1ab o sobre la estructura del RNA genómico.

Dentro del orden *Nidovirales*, estas tres enzimas de procesamiento de RNA se encuentran muy conservadas en las familias *Coronaviridae* (subfamilias *coronavirinae* y *torovirinae*) y *Roniviridae*, que tienen un genoma de aproximadamente 30 kb. Teniendo en cuenta sus actividades enzimáticas y que están ausentes en la mayoría de los virus RNA conocidos, se ha postulado que estas enzimas podrían estar implicadas en la síntesis discontinua de los sgRNAs típica del orden *Nidovirales* (Gorbalenya y col., 2006; Ivanov y col., 2004a; Snijder y col., 2003; Ziebuhr, 2005). Por otra parte, solo la NendoU se encuentra conservada en la familia *Arteviridae*, cuyos miembros tienen un genoma de alrededor de 15 kb (Posthuma y col., 2006; Snijder y col., 2003) (Tabla

XVI), sugiriendo que las actividades ExoN y 2'-O-MT presentes en los miembros de las familias *Coronaviridae* y *Roniviridae*, podrían ser necesarias para replicar eficientemente un genoma RNA de 30 kb. En este contexto, la ExoN con actividad exonucleasa 3'-5', podría haberse incorporado a los CoVs en el proceso evolutivo de los nidovirales de gran tamaño, para formar parte de un mecanismo de reparación de errores y de esta forma compensar la relativa baja fidelidad de la RdRp. En apoyo de esta hipótesis, se ha descrito que la región N-terminal de la proteína ExoN contiene los motivos I (DE), II (D) y III (D) presentes en enzimas celulares implicadas en la reparación de errores durante la síntesis de DNA (Snijder y col., 2003; Zuo y Deutscher, 2001) y que la mutación de una Ala en el motivo DE de la ExoN del MHV o del SARS-CoV produce un incremento de 12 a 20 veces en la frecuencia de mutación (Eckerle y col., 2010; Eckerle y col., 2007). Además de la actividad exonucleasa 3'-5', se ha descrito recientemente que la ExoN también tiene actividad guanina-N7-metiltransferasa (Chen y col., 2009b) y se ha postulado que junto con la 2'-O-MT podrían ser las enzimas virales responsables de la formación de la estructura cap del RNA viral (Decroly y col., 2008). Por otra parte, resultados recientes indican que la 2'-O-MT podría regular la respuesta antiviral mediada por interferón, mediante la metilación de los mRNAs virales (Zust y col., 2011). Este proceso contribuiría a que la célula reconociese a los mRNAs virales como propios y no se activase una respuesta antiviral (Daffis y col., 2010; Garcia-Sastre, 2011; Zust y col., 2011). Por tanto las enzimas estudiadas podrían tener funciones importantes en diversas etapas de la infección.

**TABLA XVI. CONSERVACIÓN DE LAS ENZIMAS DE METABOLISMO DE RNA EN CoV**

<b>Nidovirus<sup>(a)</sup></b>	<b>NendoU</b>	<b>ExoN</b>	<b>2'-O-MT</b>	<b>Genoma<sup>(b)</sup></b>
<i>Coronaviridae</i>				
<i>Coronavirinae</i>	+	+	+	27-32
<i>Torovirinae</i>	+	+	+	28
<i>Roniviridae</i>	+	+	+	26
<i>Arteriviridae</i>	+	-	-	13-16

(a) Se muestran las familias y subfamilias del orden *Nidovirales* (ver también Figura 1).

(b) Tamaño de los genomas virales en kb.

Con el fin de caracterizar las factorías de replicación en CoVs, se generó una colección de anticuerpos frente a varias proteínas de la replicasa viral. En este estudio se utilizó como modelo de trabajo el CoV TGEV del género  $\alpha$  ya que, a diferencia del SARS-CoV, el TGEV puede ser manipulado en laboratorios de contención biológica tipo 2.

La RdRp es una proteína clave en la replicación y transcripción del genoma viral, por lo que la disponibilidad de anticuerpos específicos frente a la RdRp facilitaría significativamente el estudio del CRT de CoV. Con este fin, se generó una colección de seis Acms específicos de la RdRp del TGEV (Tabla XI), los cuales reconocían la proteína tanto por *Western blot* como por inmunofluorescencia (Nogales y col., 2011). Estos Acms se caracterizaron y los epítomos reconocidos se identificaron mediante “Pepscan” (Fig. 19). Los Acms reconocieron cuatro epítomos lineales no solapantes, localizados en una región de 62 aa del extremo N-terminal de la RdRp. Teniendo en cuenta que los Acms se generaron utilizando la RdRp completa como inmunógeno, estos resultados indicaban que esta región N-terminal de la RdRp constituía un dominio inmunodominante. Cuando se analizó la conservación de los epítomos identificados entre CoV representantes de los tres géneros, se observó que todos ellos estaban conservados en CoVs del género  $\alpha$  relacionados con el TGEV, como el CCoV y el FCoV (Fig. 43). Sin embargo, el epítomo reconocido por el Acm 4D10 estaba muy conservado en la mayoría de los CoVs de los tres géneros, incluyendo diversos CoVs de murciélagos, indicando que el Acm 4D10 se podría utilizar para identificar y caracterizar la RdRp de otros CoVs. De hecho, resultados recientes de nuestro laboratorio han demostrado que el Acm 4D10 reconoce la RdRp del SARS-CoV (datos no mostrados).

Utilizando los Acms generados se analizó la expresión de la RdRp en células infectadas mediante *Western blot* e inmunofluorescencia. El análisis mediante *Western blot* mostró que además de la forma monomérica de la proteína de 105 kDa, se detectaron específicamente otras proteínas con masas moleculares superiores a 150 kDa (Fig. 20), las cuales podrían corresponderse con oligómeros de la RdRp o precursores del procesamiento proteolítico de la poliproteína pp1ab. En el caso del MHV, estas proteínas de alta masa molecular se han identificado como precursores del procesamiento proteolítico de la pp1ab que contienen la RdRp (Brockway y col., 2003). Mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal, se determinó que la RdRp presentaba un patrón vesicular con una distribución perinuclear que colocalizaba con el

dsRNA (Nogales y col., 2012), el cual es un marcador de síntesis activa de RNA que se localiza en el interior de las VDMs donde tiene lugar la síntesis de RNA de CoV (Gosert y col., 2002; Knoop y col., 2008; Snijder y col., 2006). Muy posiblemente, las VDMs sirven para compartimentalizar el CRT, facilitando su organización y la evasión de la respuesta antiviral del huésped inducida por el dsRNA que se genera durante los procesos de replicación y transcripción del genoma viral.

GÉNERO		VIRUS		RdRp											
				2C11		3C12		4D10		5H1		3F9			
				93								2B5		162	
α	TGEV	VAEHDFFTYK	EGRC	EFGNVARRNLTKY	TMMDL	CYAIRNFDEKNCEVLKEILVTVGACTEE	---	FFENKDW	WFD	P					
	CCoV	VAEHDFFTYK	EGRC	EFGNVARRDLTKY	TMMDL	CYAIRNFDEKNCEVLKEILVTVGACTEE	---	FFENKDW	WFD	P					
	FCoV	VAEHDFFSYK	EGRC	EFGNVARKDLTKY	TMMDL	CYAIRNFDEKNCEVLKEILVTVGACNAA	---	FFENKDW	WFD	P					
	PEDV	IAEHDFFTWK	DGRAIYGNVCRKDLTKY	TMMDL	CYAIRNFDENNCDVLKSILIKVGACES	---	YFNKNW	WFD	P						
	HCoV-229E	VAKHDDFTW	HEGRTIYGNVSRQDLTKY	TMMDL	CYAIRNFDEKDCVFKEILVLTGCCSTD	---	YFEMKN	WFD	P						
	HCoV-NL63	LAEHDFFTWK	DGRVIYGNVSRHNLTKY	TMMDL	VLVYARNFDEQNCDDLVEKLVLTGCCDSS	---	YEDSKGW	WYD	P						
	BatCoV-512	VAKHDDFTW	EGRSVYGNVCRQDLTKY	TMMDL	CYAIRNFDENNCTLKKILVVVGACDES	---	YEDKNLW	WFD	P						
β	MHV	VAEHEFFTFD	VEGSRVPHIVRKDLTKY	TMMDL	CYAIRHFRDNCSTLKEILLTYAECDES	---	YFQRND	WYD	F						
	SARS-CoV	VAVEHDDFFK	FRVDDGMVPHISRQRLTKY	TMMDL	VLVYARHFDDEGNCDLKEILVTVYNCDDDD	---	YFNKDW	WYD	F						
	HCoV-HKU1	VAEHDFFTFD	IDGSRVIVVRNLSKY	TMMDL	CYAIRHFRDNCDSILCEILCEYADCKES	---	YESKDW	WYD	F						
	BatCoV-HKU8	VSPHDDFFVW	KDGRSVYGNVIRHDLTKY	TMMDL	VLVYALRNFDENKNCETLKEILVTSIGACDSS	---	YEDNKN	WYD	P						
γ	IBV	TADHDDFFV	FNK---NIYNISRQRLTKY	TMMDL	CYAIRHFDPKDCVFKEILVTVYGCIEDYHPKWF	FFENKDW	WYD	P							
	BWCoV SW1	VAVEHDDFF	ERFEG---MYSICRQRLTKY	TMMDL	CYAIRHFDPNDDVLK-EILVVKGCC	CEWDYFDWD	DPNDWYD	P							

**Figura 43. Conservación de los epítomos de la RdRp del TGEV en otros CoVs.** La secuencia de aa de la región de la RdRp comprendida entre los aa 93 a 162 se alineó con la secuencia de la RdRp de diversos CoV de los tres géneros ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), utilizando el programa Clustal-W (Thompson y col., 1994). La secuencia de aa de los epítomos de la RdRp del TGEV y los residuos conservados en otros CoVs se indican con cajas negras. Las secuencias fueron obtenidas de la base de datos del NCBI: TGEV (gi:13399293), CCoV (gi:214027098), FCoV (gi:302877212), PEDV (gi:121722566), HCoV-229E (gi:12175747), NL63 (gi:93004453), BtCoV-512 (gi:152994037), MHV (gi:6625761), SARS-CoV (gi:30027617), HCoV-HKU1 (gi:51235385), BatCoV-HKU8 (gi:169260929), IBV (gi:33569220), y BWCoV-SW1 (gi:187251955).

Hasta la fecha, la formación de las VDMs durante la infección solo se ha observado en los CoVs del género  $\beta$  (Gosert y col., 2002; Hagemeijer y col., 2010; Knoop y col., 2008; Oostra y col., 2008; Reggiori y col., 2010; Sims y col., 2000; van Hemert y col., 2008b). En esta tesis, se ha determinado por primera vez la formación de las VDMs en un CoV del género  $\alpha$  y se han presentado evidencias de la acumulación de la RdRp dentro de estas vesículas mediante inmunomicroscopía electrónica (Fig. 25). Sin embargo, también se detectó la presencia de la RdRp en regiones reticulovesiculares situadas junto a las VDMs. Este marcaje podría corresponder a VDMs rotas durante el procesamiento de la muestra, si bien no se puede excluir la posibilidad de que la RdRp también se encuentre fuera de las VDMs, en regiones membranosas reestructuradas durante la infección. En este sentido, se ha postulado que mientras que las formas maduras de las nsps, se encuentran dentro de las VDMs, los precursores poliprotéicos procedentes de las poliproteínas ppla y pplab, podrían encontrarse fuera de estas

estructuras a modo de almacén (Knoops y col., 2008). El empleo de otras técnicas de fijación, tales como la criofijación, que preserven mejor la estructura de las VDMs, permitirá esclarecer la localización de la RdRp y otras nsps implicadas en la síntesis de RNA de CoV.

Además de la RdRp, el gen de la replicasa codifica otras proteínas que presumiblemente forman parte del CRT responsable de la síntesis de RNA de CoV. En esta tesis se ha estudiado la presencia de las nsps 2, 3, 5 y 8 del TGEV en el CRT. La nsp2 es una proteína poco conservada entre los diferentes géneros de CoVs y su función en la síntesis de RNA viral se desconoce. Hasta la fecha, se ha descrito que en los CoVs del género  $\beta$  la nsp2 se asocia a los sitios de síntesis del RNA viral (Hagemeijer y col., 2010) y que su delección produce una reducción del 50 % en la síntesis del RNA viral (Graham y Denison, 2006). Las nsps 3 y 5 son las responsables del procesamiento proteolítico de las dos poliproteínas virales y participan en la formación de las VDMs (Balijs y col., 2009; Imbert y col., 2008; Kanjanahaluethai y col., 2007; Oostra y col., 2008; Oostra y col., 2007). Finalmente, la nsp8 o primasa tiene actividad RdRp independiente de iniciador y posiblemente es la responsable de la síntesis de los iniciadores necesarios para la síntesis de RNA mediada por la RdRp viral (Imbert y col., 2006; te Velthuis y col., 2010). Mediante *Western blot* y microscopia confocal se ha determinado que las nsps 2, 3, 5 y 8 presentan la misma cinética de expresión que la RdRp (Fig. 27) y colocalizan con la RdRp a lo largo de la infección (Fig. 28), indicando que las nsps 2, 3 5 y 8 se localizan en las VDMs y muy posiblemente forman parte del CRT junto con la RdRp.

Los anticuerpos específicos frente a la RdRp y las nsps 2, 3, 5 y 8 generados en esta tesis constituyen una herramienta fundamental para el estudio del mecanismo de replicación y transcripción de CoV, así como para analizar su función en la patogénesis de CoV.

## 2. ESTUDIO DE PROTEÍNAS CELULARES IMPLICADAS EN REPLICACIÓN DE CORONAVIRUS

En la replicación de CoV presumiblemente intervienen proteínas celulares, análogamente a lo que ha sido descrito para otros virus RNA de cadena positiva. Hasta la fecha no existe ningún estudio de proteínas celulares implicadas en la síntesis de RNA en CoV del género  $\alpha$  y los estudios realizados con los CoVs del género  $\beta$  son

limitados. En este último grupo, las proteínas potencialmente implicadas en la síntesis de RNA viral se han identificado basándose en su interacción con dominios de los extremos del RNA genómico o con componentes de la replicasa viral (Chen y col., 2009a; Choi y col., 2004; Huang y Lai, 2001; Li y col., 1999; Li y col., 1997; Shi y Lai, 2005; Sola y col., 2011b; Spagnolo y Hogue, 2000; Xu y col., 2010; Yu y Leibowitz, 1995a, b).

En esta tesis se han seguido dos estrategias complementarias para la identificación de proteínas celulares implicadas en la síntesis de RNA del CoV TGEV: (i) la identificación de proteínas que interaccionan con los extremos del genoma, donde se localizan la mayor parte de los motivos de RNA esenciales para la replicación, y (ii) la identificación de proteínas que interaccionan con la RdRp.

## **2.1 Identificación y estudio de proteínas celulares que interaccionan con los extremos del genoma del TGEV**

El aislamiento e identificación de proteínas celulares que interaccionan con los extremos del genoma del TGEV, se realizó mediante cromatografía de afinidad a RNA y espectrometría de masas. Se identificaron 10 proteínas que se unieron preferentemente a los primeros 500 nt del extremo 5' o 3' del genoma (Fig. 29). Nueve de ellas, entre las que se incluyen varias hnRNPs (A1, A0, A2B1, Q y U), los factores de traducción PABP, EPRS y RRS y el co-activador transcripcional p100, mostraron una unión preferencial por el extremo 3' del genoma, mientras que solo la PTB se unió preferentemente al extremo 5'. La relevancia funcional de estas proteínas en la síntesis de RNA de CoV se analizó mediante silenciamiento génico utilizando siRNAs específicos. Estos estudios mostraron que la PABP, hnRNP Q y EPRS afectaban positivamente a la síntesis de RNA y a la producción viral, mientras que la GAPDH, utilizada como control en los experimentos de silenciamiento, produjo el efecto contrario (Fig. 31 y 32). Los efectos del silenciamiento génico descritos en este trabajo sobre la actividad del replicón del TGEV, fueron reproducibles y estadísticamente significativos utilizando dos siRNAs diferentes por gen y proporcionales al nivel de silenciamiento debido a cada siRNA. Además, los efectos observados sobre el replicón del TGEV, también se observaron en el contexto de la infección viral, utilizando las células Huh-7 en lugar de 293T, confirmando que estos efectos eran reproducibles, independientemente del sistema experimental y del tipo celular utilizado. Por otra parte, aunque el efecto observado en la síntesis del RNA viral y en los títulos virales fue



moderado, estos resultados fueron cuantitativamente muy similares a los obtenidos en otros sistemas virales (Hara y col., 2009; Pettit Kneller y col., 2009).

Entre las proteínas identificadas, la PTB y las hnRNPs A1, A2B1, A0, Q y U están implicadas en *splicing*. Aunque estas proteínas son predominantemente nucleares y la replicación del genoma viral tiene lugar en el citoplasma, estas proteínas podrían translocarse al citoplasma durante la infección y de este modo colaborar en la replicación viral. Un ejemplo claro de este fenómeno, lo constituye la hnRNP A1, la cual durante la infección por MHV se relocaliza desde el núcleo hacia los sitios de síntesis del RNA viral en el citoplasma (Li y col., 1997). Teniendo en cuenta que la transcripción en CoV implica la fusión de secuencias no continuas mediante un mecanismo de síntesis discontinua de RNA, los factores de *splicing* identificados podrían estar interviniendo durante la transcripción en CoV acercando las secuencias de RNA implicadas, como ocurre en el proceso de *splicing* celular. Estudios previos realizados con el CoV MHV, han mostrado que la PTB y las hnRNPs A1 y Q interaccionan con los extremos del genoma y afectan a la síntesis del RNA viral (Choi y col., 2002; Choi y col., 2004; Huang y Lai, 2001). En esta tesis, se han identificado dos nuevos factores de *splicing*, las hnRNPs A2B1 y A0, que interaccionan específicamente con el extremo 3' del genoma. Además, se ha determinado que la hnRNP Q, previamente descrita por su interacción con el extremo 5' del MHV (Choi y col., 2004), interacciona con ambos extremos del genoma presentando una marcada preferencia por el extremo 3' (Fig. 30) y que su silenciamiento afecta negativamente a la síntesis del RNA viral, de forma similar a lo descrito en MHV (Choi y col., 2004). Por otra parte, recientemente, se ha descrito que la PTB es un factor negativo en la síntesis de RNA del TGEV (Sola y col., 2011a) y que junto con la hnRNP A1 podría estar implicada en la posible interacción de los extremos del genoma durante el proceso de replicación (Huang y Lai, 2001).

En esta tesis se ha descrito la interacción específica del co-activador transcripcional p100 con el extremo 3' del genoma del TGEV, sugiriendo un posible papel de esta proteína en la síntesis de RNA de CoV. De hecho, en estudios recientes con el arterivirus EAV, se ha descrito que la proteína p100 interacciona con la proteína viral nsp1 (Tijms y Snijder, 2003), la cual es esencial para la transcripción del RNA viral.

El silenciamiento génico de la proteína PABP, la cual se une preferencialmente al extremo 3' del genoma del TGEV, causó una disminución en la síntesis del RNA viral que se correlacionó con una disminución del título viral. Aunque la unión de la PABP al

poliA del extremo 3' del genoma viral se había descrito para el BCoV (Spagnolo y Hogue, 2000), los estudios de esta tesis, muestran por primera vez un papel funcional de la PABP en la síntesis de RNA de CoVs. Teniendo en cuenta que el genoma de CoV se asemeja estructuralmente a los mRNA celulares y que la traducción del mismo es dependiente del cap, es lógico proponer que la interacción de factores celulares con el cap en el extremo 5' del genoma y la PABP con el extremo 3', podría contribuir a la circularización del genoma para su traducción. Este mecanismo favorecería el reciclamiento de los ribosomas durante la traducción, la selección de los genomas completos como moldes, y la regulación controlada del cambio de traducción a síntesis de RNA.

Una aportación novedosa de esta tesis, es la unión preferencial de la EPRS al extremo 3' del genoma del TGEV y su implicación en la síntesis de RNA y producción viral. Las aminoacil-tRNA sintetasas, como la EPRS, son enzimas fundamentales para el proceso de traducción y catalizan la adición del amino ácido específico al tRNA correspondiente (Ibba y Soll, 2000). En vertebrados, estas enzimas han adquirido funciones adicionales y se han implicado en el silenciamiento de la traducción, en la regulación de la expresión de ciertas citoquinas y en *splicing*, entre otras (Jia y col., 2008; Sampath y col., 2004). Además, se ha descrito que estas enzimas juegan un papel fundamental en diversos sistemas virales. En retrovirus están implicadas en la encapsidación de tRNAs que son utilizados posteriormente como iniciadores en el proceso de transcripción reversa (Cen y col., 2002). En el caso de algunos virus RNA de plantas, se ha descrito que estas enzimas son utilizadas para la aminoacilación de dominios de RNA semejantes al tRNA, situados en el extremo 3' del genoma, con el fin de regular la replicación viral (Dreher, 2008; Kohl y Hall, 1974). En el caso de CoV, la EPRS podría tener un papel similar en replicación, si bien no se puede descartar un papel en la traducción del genoma viral, donde la EPRS junto con otras aminoacil-tRNA sintetasas, como la RRS, serían reclutadas mediante su unión específica al extremo 3' del genoma viral, y de esta forma competir con los mRNA celulares por la maquinaria de traducción.

Finalmente, en esta tesis se ha determinado que el silenciamiento de GAPDH tiene un efecto positivo tanto en la síntesis de RNA viral, como en los títulos virales. Recientemente, se ha mostrado en nuestro laboratorio que la GAPDH interacciona con la TRS del líder en el extremo 5' del genoma (datos no publicados). Esta interacción podría ser la responsable del efecto que la GAPDH ejerce sobre la síntesis de RNA y la

producción viral. En línea con estos resultados, se ha observado una reducción de la expresión de GAPDH en células infectadas con SARS-CoV y en células transfectadas con la nsp1 (Kamitani y col., 2006; Wathelet y col., 2007). La GAPDH es una enzima glicolítica con capacidad de unión a RNA, para la cual se han descrito diversas funciones en varios sistemas virales. En picornavirus, ha sido implicada en la supresión de la traducción independiente de cap mediante la interacción y desestabilización del IRES (Yi y col., 2000), mientras que en tombusvirus la GAPDH forma parte del complejo de replicación y regula la síntesis asimétrica del RNA viral (Wang y Nagy, 2008). Dado que en CoV esta enzima tiene un efecto negativo sobre la síntesis de RNA y producción viral, se puede especular que la GAPDH podría tener un papel importante contrarrestando la infección por CoVs o afectando el balance de los factores celulares que afectan positivamente a la síntesis de RNA de CoV.

## 2.2. Análisis de proteínas celulares que interaccionan con la RdRp del TGEV

Una aproximación alternativa para la identificación de factores celulares implicados en la síntesis de RNA de CoV es la identificación de proteínas celulares que interaccionan con componentes de la replicasa viral. En este trabajo se han analizado proteínas que interaccionan con la RdRp del TGEV mediante la purificación de complejos proteicos usando la tecnología del TAP (Puig y col., 2001), o mediante el sistema de doble híbrido en levaduras.

Mediante la aproximación del TAP, se identificaron de forma reproducible 4 proteínas celulares que interaccionaban con la RdRp, entre las que se incluían la HSP70, la  $\beta$ -actina, la subunidad  $1\alpha$  de la caseína y el factor de *splicing* PUF60. La proteína HSP70 es una chaperona implicada en el correcto plegamiento de las proteínas. Esta proteína se induce en condiciones de estrés celular, como es el caso de las infecciones virales, donde puede desempeñar múltiples funciones, participando en procesos de síntesis de RNA, plegamiento proteico y ensamblaje o maduración de viriones (Mayer, 2005). En CoV se ha descrito su interacción con el extremo 3' del genoma del MHV (Nanda y col., 2004), pero se desconoce si tiene un papel funcional en la infección viral. La  $\beta$ -actina es una proteína del citoesqueleto. La participación de proteínas del citoesqueleto es crucial a lo largo de múltiples pasos durante el ciclo de replicación de los virus, regulando el transporte intracelular del RNA, así como el ensamblaje maduración y liberación de las partículas virales (Dohner y Sodeik, 2005). Finalmente, el factor de *splicing* PUF60 que está implicado en el procesamiento del pre-mRNA

(Hastings y col., 2007; Page-McCaw y col., 1999), podría ser reclutado por la RdRp para regular la síntesis de RNA en CoVs.

Mediante el sistema de doble híbrido en levaduras, utilizando como cebo la RdRp del TGEV, se identificó de forma reproducible el factor de transcripción TRIM27, que regula negativamente la actividad de varios factores de transcripción implicados en la respuesta antiviral e inflamación, como el factor nuclear  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) y los factores reguladores de interferón 3 y 7 (IRF3 y IRF7) (Ozato y col., 2008; Shimono y col., 2003; Zha y col., 2006). Por lo tanto, en la infección por CoV, esta proteína podría ser utilizada para modular la respuesta antiviral de la célula.

Actualmente, se está analizando la interacción de estas proteínas con la RdRp viral mediante co-inmunoprecipitación y se está estudiando la relevancia funcional de estas proteínas en la síntesis de RNA de CoV mediante ensayos de silenciamiento génico.

### **3. ESTUDIO DE LA ENCAPSIDACIÓN DE COMPONENTES DEL CRT EN LAS PARTÍCULAS VIRALES**

A diferencia de los virus RNA de polaridad negativa, es comúnmente aceptado que en los virus RNA de polaridad positiva el CRT no se incorpora en las partículas virales. Sin embargo, la reciente aplicación de las técnicas de proteómica para analizar la composición proteica de los viriones ha puesto en duda esta afirmación. En este sentido, se ha descrito la presencia de las nsps 2, 3 y 5 en la partícula viral del SARS-CoV mediante el análisis proteómico de viriones purificados (Neuman y col., 2008). Sin embargo, con esta técnica no se puede descartar que las nsps detectadas sean contaminantes asociados al exterior de la partícula viral o que estén presentes en vesículas arrastradas durante el proceso de purificación.

En el presente trabajo se ha estudiado la encapsidación de la RdRp y las nsps 2, 3 y 8 del TGEV mediante el análisis de virus altamente purificado por espectrometría de masas, *Western blot*, ensayos de protección a proteasa K, inmunofluorescencia e inmunomicroscopía electrónica (Nogales y col., 2012). En conjunto, los datos obtenidos indican que la RdRp y las nsps 2 y 8 se incorporan en el interior de la partícula viral, mientras que la nsp3 se localiza muy posiblemente en la envuelta viral exponiendo la región N-terminal de la proteína hacia el exterior de la partícula viral. Recientemente, en nuestro laboratorio se ha demostrado la interacción de la nsp3 con la proteína estructural E en células infectadas con el SARS-CoV (Alvarez y col., 2010), la cual está

mediada por el extremo N-terminal de la nsp3. Basándonos en esta observación y en los datos presentados en esta tesis, podríamos postular que esta interacción también ocurre en la partícula viral.

Dado que la RdRp y otros componentes virales del CRT del TGEV se encapsidaban, se estudió la posible encapsidación de proteínas celulares implicadas en la síntesis de RNA de CoV. Para ello, la presencia en la partícula viral de las proteínas celulares implicadas en la síntesis de RNA de CoV descritas en esta tesis, GAPDH, PABP, hnRNP Q y EPRS, se analizó mediante espectrometría de masas, *Western blot* e inmunomicroscopía electrónica. Mediante análisis proteómicos de los viriones purificados se identificaron la GAPDH y la PABP y su presencia en las partículas virales fue posteriormente confirmada mediante *Western blot* e inmunomicroscopía electrónica. En el caso de las proteínas hnRNP Q y EPRS, los anticuerpos no funcionaron en inmunomicroscopía electrónica, por lo que su presencia en las partículas virales solo pudo ser confirmada mediante *Western blot*. Por otra parte, la no detección de la hnRNP Q y la EPRS en el análisis proteómico de los viriones purificados, puede ser explicado por la menor abundancia de estas proteínas en la partícula viral, como se desprende del análisis por *Western blot* (Fig. 41), lo que dificultaría su detección con respecto a otras proteínas mas abundantes, como la GAPDH y la PABP. Además, debido a que las proteínas analizadas son de origen porcino y que la secuencia de cerdo está incompleta en las bases de datos, la mayoría de las proteínas se identificaron por homología con las de la especie humana, lo que puede haber dificultado la identificación de otras proteínas celulares en la partícula viral.

Además de las proteínas celulares analizadas, en el análisis proteómico de los viriones purificados del TGEV se identificaron otras proteínas celulares (Tabla XIV), las cuales podrían tener papeles clave en el ciclo viral. Las proteínas identificadas están implicadas en una gran variedad de procesos biológicos y en su mayoría han sido también identificadas en viriones purificados del SARS-CoV (Neuman y col., 2008) y del IBV (Kong y col., 2010). Entre estas proteínas, se incluyen varias chaperonas moleculares (HSP90 y calnexina) y proteínas del citoesqueleto ( $\beta$ -actina, tubulina, fascina y TCP1), las cuales están implicadas en los procesos de entrada, replicación y ensamblaje de muchos virus (Burch y Weller, 2005; Dohner y Sodeik, 2005; Geller y col., 2007; Maggioni y Braakman, 2005; Mayer, 2005; Nakagawa y col., 2007; Okamoto y col., 2006), varias proteínas implicadas en la regulación del metabolismo de la glucosa (piruvato carboxilasa y piruvato kinasa), el receptor del TGEV pAPN, la

dipeptidilpeptidasa IV que está implicada en transducción de señales y regulación del sistema inmune (Havre y col., 2008; Ikushima y col., 2000), las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la ATP sintasa mitocondrial y el factor de elongación de la traducción eEF2. Finalmente, entre las proteínas celulares identificadas, la mas abundante es la proteína Mov10, la cual no había sido identificada previamente en otros CoVs. Esta proteína es una helicasa de RNA que interviene en el silenciamiento génico mediado por el complejo RISC (Chendrimada y col., 2007; Meister y col., 2005) y ha sido implicada en la replicación de varios virus RNA. En HDV, esta proteína facilita el proceso de transcripción del genoma viral (Haussecker y col., 2008), mientras que en el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y otros retrovirus inhibe la replicación viral en múltiples fases, como el procesamiento proteolítico de la proteína viral Gag, la transcripción reversa y la producción viral (Abudu y col., 2012; Burdick y col., 2010; Furtak y col., 2010; Wang y col., 2010). Además, la Mov10 se incorpora en las partículas virales del HIV e induce una disminución en la infectividad viral mediante la inhibición del proceso de transcripción reversa (Abudu y col., 2012; Burdick y col., 2010; Furtak y col., 2010; Wang y col., 2010). En el caso de CoVs, la encapsidación de la Mov10 podría tener un efecto similar sobre la síntesis del RNA viral.

En conjunto, los datos obtenidos indican que los CoVs incorporan en la partícula viral proteínas virales y celulares implicadas en la síntesis del RNA viral. Estas proteínas podrían formar parte de un CRT encargado de llevar a cabo al inicio de la infección una primera amplificación del genoma viral antes de su traducción y de este modo asegurar la infección viral. Con el objeto de confirmar esta hipótesis, se han realizado varios estudios con el fin de analizar la actividad RdRp en viriones purificados y permeabilizados con Triton X-100. Si bien, dentro del virión se encuentra la nsp8 (primasa) y el genoma viral que podría actuar de molde, solo se detectó una actividad basal cuando se añadió en el ensayo un molde de poliA y el iniciador OligoU<sub>16</sub>. Estos datos podrían sugerir que en el virión el genoma viral no es accesible al CRT por estar empaquetado con la proteína N y que solamente cuando se produce el desensamblaje de la partícula viral al inicio de la infección, el genoma es susceptible de ser replicado por el CRT encapsidado. Alternativamente, la baja actividad observada podría ser explicada por la desestructuración del CRT debida al tratamiento de la partícula viral con Triton X-100. En este sentido, actualmente se están probando diferentes procedimientos químicos y físicos que permitan mimetizar el proceso de desencapsidación sin afectar a la estructura del CRT. Por otra parte, nos proponemos llevar a cabo diversos estudios en

cultivos celulares, con el fin de determinar si al inicio de la infección existe una etapa de replicación mediada por el CRT encapsidado, previa a la traducción del genoma viral.

## **VIII. CONCLUSIONES**



1. Se ha generado un replicón del SARS-CoV en un cromosoma artificial de bacterias. El replicón generado era funcional en varias líneas celulares y fue estable durante su propagación en *E.coli*.
2. Utilizando el replicón del SARS-CoV, se ha demostrado que las enzimas de procesamiento de RNA, exoribonucleasa, endoribonucleasa y 2'-O-ribosa metiltransferasa, son esenciales para la síntesis eficiente de RNA de CoV.
3. Con el fin de estudiar el mecanismo de replicación de CoV, se han generado anticuerpos monoclonales específicos para la RdRp y anticuerpos policlonales específicos para la RdRp y las nsps 2, 3, 5 y 8 del TGEV. Los anticuerpos monoclonales específicos para la RdRp reconocieron 4 epítomos lineales no solapantes, localizados en una región de 62 aa que se extendía desde el residuo 97 al 158, indicando que esta región del extremo N-terminal de la RdRp es un dominio inmunodominante. De los 4 epítomos, el reconocido por el anticuerpo monoclonal 4D10 está altamente conservado en la mayoría de los CoVs, indicando que este anticuerpo puede ser utilizado para identificar y caracterizar la RdRp de otros CoVs.
4. La RdRp y las nsps 2, 3, 5 y 8 del TGEV presentaron las mismas cinéticas de expresión y todas ellas colocalizaron con el dsRNA en unas vesículas citoplasmáticas y perinucleares, que se identificaron como las vesículas de doble membrana donde tiene lugar la síntesis de RNA de CoV.
5. Se han identificado 10 proteínas celulares que interaccionaban preferentemente con uno de los extremos del genoma del TGEV. La PTB se unió preferentemente al extremo 5', mientras que el resto de las proteínas se unieron preferentemente al extremo 3'. Este grupo incluye varias hnRNPs (A1, A0, A2B1, Q y U) implicadas en el metabolismo y procesamiento del RNA, los factores de traducción EPRS, RRS y PABP, y el co-activador transcripcional p100. Se ha demostrado que de estas proteínas, la PABP, hnRNP Q y EPRS tienen un papel positivo en la síntesis de RNA y en la producción viral, mientras que la GAPDH tiene un papel negativo.
6. Mediante la tecnología del TAP y la del doble híbrido, se ha determinado que las proteínas celulares HSP70,  $\beta$ -actina, la subunidad 1 $\alpha$  de la caseína, el factor de splicing PUF60 y el factor de transcripción TRIM27, interaccionaban con la RdRp del TGEV.

7. Se ha estudiado la encapsidación de varios componentes virales y celulares del CRT mediante proteómica, *Western blot*, inmunofluorescencia e inmunomicroscopía electrónica de viriones purificados del TGEV. Se ha determinado que la RdRp, la nsp2 y la nsp8 se incorporaban en el interior de la partícula viral, mientras que la nsp3 posiblemente se localizaba en la envuelta viral. Además de las proteínas virales, se ha determinado que las proteínas celulares GAPDH y PABP y posiblemente hnRNP Q y EPRS, todas ellas implicadas en la síntesis de RNA de CoV, también se incorporaban en la partícula viral.

## **IX. BIBLIOGRAFÍA**

- Abudu, A., Wang, X., Dang, Y., Zhou, T., Xiang, S.H., Zheng, Y.H., 2012.** Identification of Molecular Determinants from Moloney Leukemia Virus 10 Homolog (MOV10) Protein for Virion Packaging and Anti-HIV-1 Activity. *J. Biol. Chem.* **287**, 1220-1228.
- Ahlquist, P., Noueiry, A.O., Lee, W.M., Kushner, D.B., Dye, B.T., 2003.** Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J. Virol.* **77**, 8181-8186.
- Almazan, F., DeDiego, M.L., Galan, C., Escors, D., Alvarez, E., Ortego, J., Sola, I., Zúñiga, S., Alonso, S., Moreno, J.L., Nogales, A., Capiscol, C., Enjuanes, L., 2006.** Construction of a SARS-CoV infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis. *J. Virol.* **80**, 10900-10906.
- Almazan, F., Galan, C., Enjuanes, L., 2004.** The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J. Virol.* **78**, 12683-12688.
- Almazan, F., Gonzalez, J.M., Penzes, Z., Izeta, A., Calvo, E., Plana-Duran, J., Enjuanes, L., 2000.** Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5516-5521.
- Alonso, S., Sola, I., Teifke, J., Reimann, I., Izeta, A., Balach, M., Plana-Durán, J., Moormann, R.J.M., Enjuanes, L., 2002.** In vitro and in vivo expression of foreign genes by transmissible gastroenteritis coronavirus-derived minigenomes. *J. Gen. Virol.* **83**, 567-579.
- Alvarez, E., DeDiego, M.L., Nieto-Torres, J.L., Jimenez-Guardeno, J.M., Marcos-Villar, L., Enjuanes, L., 2010.** The envelope protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus interacts with the non-structural protein 3 and is ubiquitinated. *Virology* **402**, 281-291.
- Baliji, S., Cammer, S.A., Sobral, B., Baker, S.C., 2009.** Detection of nonstructural protein 6 in murine coronavirus-infected cells and analysis of the transmembrane topology by using bioinformatics and molecular approaches. *J. Virol.* **83**, 6957-6962.
- Bálint, A., Farsang, A., Zádori, Z., Hornyák, A., Dencso, L., Almazan, F., Enjuanes, L., Belák, S., 2012.** Molecular characterization of feline infectious peritonitis virus strain DF-2 and studies on the role of ORF3abc in viral cell tropism. *J. Virol.* Submitted.
- Baric, R.S., Yount, B., 2000.** Subgenomic negative-strand RNA function during mouse hepatitis virus infection. *J. Virol.* **74**, 4039-4046.
- Boguszewska-Chachulska, A.M., Haenni, A.L., 2005.** RNA viruses redirect host factors to better amplify their genome. *Adv. Virus Res.* **65**, 29-61.
- Brass, A.L., Dykxhoorn, D.M., Benita, Y., Yan, N., Engelman, A., Xavier, R.J., Lieberman, J., Elledge, S.J., 2008.** Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* **319**, 921-926.
- Bremer, A., Häner, M., Aebi, U., 1998.** Negative staining, *in*: Celis, J.E. (Ed.), Cell biology. A laboratory handbook, Second ed. Academic Press, San Diego, pp. 277-284.
- Brian, D.A., Baric, R.S., 2005.** Coronavirus genome structure and replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **287**, 1-30.

- Brian, D.A., Hogue, B.G., Kienzle, T.E.**, 1995. The coronavirus hemagglutinin esterase glycoprotein, *in*: Siddell, S.G. (Ed.), The coronaviridae. Plenum press, New York, pp. 165-176.
- Brian, D.A., Spaan, W.J.M.**, 1997. Recombination and coronavirus defective interfering RNAs. *Semin. Virol.* **8**, 101-111.
- Brierley, I., Bournsnel, M.E., Binns, M.M., Bilimoria, B., Blok, V.C., Brown, T.D., Inglis, S.C.**, 1987. An efficient ribosomal frame-shifting signal in the polymerase-encoding region of the coronavirus IBV. *EMBO J.* **6**, 3779-3785.
- Brierley, I., Digard, P., Inglis, S.C.**, 1989. Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot. *Cell* **57**, 537-547.
- Brockway, S.M., Clay, C.T., Lu, X.T., Denison, M.R.**, 2003. Characterization of the expression, intracellular localization, and replication complex association of the putative mouse hepatitis virus RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.* **77**, 10515-10527.
- Brown, C.G., Nixon, K.S., Senanayake, S.D., Brian, D.A.**, 2007. An RNA stem-loop within the bovine coronavirus nsp1 coding region is a cis-acting element in defective interfering RNA replication. *J. Virol.* **81**, 7716-7724.
- Burch, A.D., Weller, S.K.**, 2005. Herpes simplex virus type 1 DNA polymerase requires the mammalian chaperone hsp90 for proper localization to the nucleus. *J. Virol.* **79**, 10740-10749.
- Burdick, R., Smith, J.L., Chaipan, C., Friew, Y., Chen, J., Venkatachari, N.J., Delviks-Frankenberry, K.A., Hu, W.S., Pathak, V.K.**, 2010. P body-associated protein Mov10 inhibits HIV-1 replication at multiple stages. *J. Virol.* **84**, 10241-10253.
- Carstens, E.B.**, 2010. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). *Arch. Virol.* **155**, 133-146.
- Casais, R., Thiel, V., Siddell, S.G., Cavanagh, D., Britton, P.**, 2001. Reverse genetics system for the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *J. Virol.* **75**, 12359-12369.
- Cen, S., Javanbakht, H., Kim, S., Shiba, K., Craven, R., Rein, A., Ewalt, K., Schimmel, P., Musier-Forsyth, K., Kleiman, L.**, 2002. Retrovirus-specific packaging of aminoacyl-tRNA synthetases with cognate primer tRNAs. *J. Virol.* **76**, 13111-13115.
- Chang, R.Y., Hofmann, M.A., Sethna, P.B., Brian, D.A.**, 1994. A cis-acting function for the coronavirus leader in defective interfering RNA replication. *J. Virol.* **68**, 8223-8231.
- Chang, R.Y., Krishnan, R., Brian, D.A.**, 1996. The UCUAAAC promoter motif is not required for high-frequency leader recombination in bovine coronavirus defective interfering RNA. *J. Virol.* **70**, 2720-2729.
- Chen, C., Okayama, H.**, 1987. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Molecular and Cellular Biology* **7**, 2745-2752.

- Chen, J.Y., Chen, W.N., Poon, K.M., Zheng, B.J., Lin, X., Wang, Y.X., Wen, Y.M.,** 2009a. Interaction between SARS-CoV helicase and a multifunctional cellular protein (Ddx5) revealed by yeast and mammalian cell two-hybrid systems. *Arch. Virol.* **154**, 507-512.
- Chen, S.C., Olsthoorn, R.C.,** 2010. Group-specific structural features of the 5'-proximal sequences of coronavirus genomic RNAs. *Virology* **401**, 29-41.
- Chen, Y., Cai, H., Pan, J., Xiang, N., Tien, P., Ahola, T., Guo, D.,** 2009b. Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 3484-3489.
- Chendrimada, T.P., Finn, K.J., Ji, X., Baillat, D., Gregory, R.I., Liebhaber, S.A., Pasquinelli, A.E., Shiekhattar, R.,** 2007. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* **447**, 823-828.
- Cheng, A., Zhang, W., Xie, Y., Jiang, W., Arnold, E., Sarafianos, S.G., Ding, J.,** 2005. Expression, purification, and characterization of SARS coronavirus RNA polymerase. *Virology* **335**, 165-176.
- Choi, K.S., Huang, P., Lai, M.M.,** 2002. Polypyrimidine-tract-binding protein affects transcription but not translation of mouse hepatitis virus RNA. *Virology* **303**, 58-68.
- Choi, K.S., Mizutani, A., Lai, M.M.,** 2004. SYNCRIP, a member of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein family, is involved in mouse hepatitis virus RNA synthesis. *J. Virol.* **78**, 13153-13162.
- Coley, S.E., Lavi, E., Sawicki, S.G., Fu, L., Schelle, B., Karl, N., Siddell, S.G., Thiel, V.,** 2005. Recombinant mouse hepatitis virus strain a59 from cloned, full-length cDNA replicates to high titers in vitro and is fully pathogenic in vivo. *J. Virol.* **79**, 3097-3106.
- Correa, I., Jiménez, G., Suñé, C., Bullido, M.J., Enjuanes, L.,** 1988. Antigenic structure of the E2 glycoprotein from transmissible gastroenteritis coronavirus. *Virus Res.* **10**, 77-94.
- Curtis, K.M., Yount, B., Sims, A.C., Baric, R.S.,** 2004. Reverse genetic analysis of the transcription regulatory sequence of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.* **78**, 6061-6066.
- Daffis, S., Szretter, K.J., Schriewer, J., Li, J., Youn, S., Errett, J., Lin, T.Y., Schneller, S., Züst, R., Dong, H., Thiel, V., Sen, G.C., Fensterl, V., Klimstra, W.B., Pierson, T.C., Buller, R.M., Gale, M., Jr., Shi, P.Y., Diamond, M.S.,** 2010. 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature* **468**, 452-456.
- Dalton, K., Casais, R., Shaw, K., Stirrups, K., Evans, S., Britton, P., Brown, T.D.K., Cavanagh, D.,** 2001. *cis*-acting sequences required for coronavirus infectious bronchitis virus defective-RNA replication and packaging. *J. Virol.* **75**, 125-133.
- de Groot, R.J., Baker, S.C., Baric, R., Enjuanes, L., Gorbalenya, A.E., Holmes, K.V., Perlman, S., Poon, L., Rottier, P.J.M., Talbot, P.J., Woo, P.C.Y., Ziebuhr, J.,** 2011. Coronaviridae, *in*: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 774-796.

- Decroly, E., Imbert, I., Coutard, B., Bouvet, M., Selisko, B., Alvarez, K., Gorbalenya, A.E., Snijder, E.J., Canard, B., 2008.** Coronavirus nonstructural protein 16 is a cap-0 binding enzyme possessing (nucleoside-2'O)-methyltransferase activity. *J. Virol.* **82**, 8071-8084.
- DeDiego, M.L., Alvarez, E., Almazan, F., Rejas, M.T., Lamirande, E., Roberts, A., Shieh, W.J., Zaki, S.R., Subbarao, K., Enjuanes, L., 2007.** A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *J. Virol.* **81**, 1701-1713.
- Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, L.K., Norén, O., Laude, H., 1992.** Amino-peptidase N is a major receptor for the enteropathogenic coronavirus TGEV. *Nature* **357**, 417-420.
- Delmas, B., Gelfi, J., Laude, H., 1986.** Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus. II. Domains in the peplomer glycoprotein. *J. Gen. Virol.* **67**, 1405-1418.
- Delmas, B., Laude, H., 1990.** Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression. *J. Virol.* **64**, 5367-5375.
- Deming, D.J., Graham, R.L., Denison, M.R., Baric, R.S., 2007.** Processing of open reading frame 1a replicase proteins nsp7 to nsp10 in murine hepatitis virus strain A59 replication. *J Virol* **81**, 10280-10291.
- Devaraj, S.G., Wang, N., Chen, Z., Chen, Z., Tseng, M., Barretto, N., Lin, R., Peters, C.J., Tseng, C.T., Baker, S.C., Li, K., 2007.** Regulation of IRF-3-dependent innate immunity by the papain-like protease domain of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Biol. Chem.* **282**, 32208-32221.
- Dohner, K., Sodeik, B., 2005.** The role of the cytoskeleton during viral infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **285**, 67-108.
- Dominguez, S.R., O'Shea, T.J., Oko, L.M., Holmes, K.V., 2007.** Detection of group 1 coronaviruses in bats in North America. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 1295-1300.
- Donaldson, E.F., Sims, A.C., Graham, R.L., Denison, M.R., Baric, R.S., 2007.** Murine hepatitis virus replicase protein nsp10 is a critical regulator of viral RNA synthesis. *J Virol* **81**, 6356-6368.
- Donaldson, E.F., Yount, B., Sims, A.C., Burkett, S., Pickles, R.J., Baric, R.S., 2008.** Systematic assembly of a full-length infectious clone of human coronavirus NL63. *J. Virol* **82**, 11948-11957.
- Doyle, L.P., Hutchings, L.M., 1946.** A transmissible gastroenteritis in pigs. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* **108**, 257-259.
- Dreher, T.W., 2008.** Role of tRNA-like structures in controlling plant virus replication. *Virus Res.*, doi:10.1016/j.virusres.2008.1006.1010
- Drexler, J.F., Gloza-Rausch, F., Glende, J., Corman, V.M., Muth, D., Goettsche, M., Seebens, A., Niedrig, M., Pfefferle, S., Yordanov, S., Zhelyazkov, L., Hermanns, U., Vallo, P., Lukashev, A., Muller, M.A., Deng, H., Herrler, G., Drosten, C., 2010.** Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *J. Virol.* **84**, 11336-11349.

- Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R.A., Berger, A., Burguiere, A.M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriu, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J.C., Muller, S., Rickerts, V., Sturmer, M., Vieth, S., Klenk, H.D., Osterhaus, A.D., Schmitz, H., Doerr, H.W., 2003.** Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1967-1976.
- Eckerle, L.D., Becker, M.M., Halpin, R.A., Li, K., Venter, E., Lu, X., Scherbakova, S., Graham, R.L., Baric, R.S., Stockwell, T.B., Spiro, D.J., Denison, M.R., 2010.** Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLoS Pathog.* **6**, e1000896.
- Eckerle, L.D., Lu, X., Sperry, S.M., Choi, L., Denison, M.R., 2007.** High fidelity of murine hepatitis virus replication is decreased in nsp14 exonuclease mutants. *J. Virol.* **81**, 12135-12144.
- Egloff, M.P., Ferron, F., Campanacci, V., Longhi, S., Rancurel, C., Dutartre, H., Snijder, E.J., Gorbalenya, A.E., Cambillau, C., Canard, B., 2004.** The severe acute respiratory syndrome-coronavirus replicative protein nsp9 is a single-stranded RNA-binding subunit unique in the RNA virus world. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 3792-3796.
- Enjuanes, L., Almazan, F., Sola, I., Zuniga, S., 2006a.** Biochemical aspects of coronavirus replication and virus-host interaction. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**, 211-230.
- Enjuanes, L., Almazan, F., Sola, I., Zuniga, S., Alvarez, E., Reguera, J., Capiscol, C., 2006b.** Biochemical aspects of coronavirus replication. *Adv. Exp. Med. Biol.* **581**, 13-24.
- Enjuanes, L., Gorbalenya, A.E., de Groot, R.J., Cowley, J.A., Ziebuhr, J., Snijder, E.J., 2008a.** The Nidovirales, *in*: Mahy, B.W.J., Van Regenmortel, M., Walker, P., Majumder-Russell, D. (Eds.), *Encyclopedia of Virology*, Third Edition. Elsevier Ltd., Oxford, pp. 419-430.
- Enjuanes, L., Sola, I., Zuñiga, S., Almazán, F., 2008b.** Coronavirus replication and interaction with host, *in*: Mettenleiter, T.C., Sobrino, F. (Eds.), *Animal viruses. Molecular biology*. Caister Academic Press, Norfolk, pp. 149-202.
- Enjuanes, L., Van der Zeijst, B.A.M., 1995.** Molecular basis of transmissible gastroenteritis coronavirus epidemiology, *in*: Siddell, S.G. (Ed.), *The Coronaviridae*. Plenum Press, New York, pp. 337-376.
- Eriksson, K.K., Cervantes-Barragan, L., Ludewig, B., Thiel, V., 2008.** Mouse hepatitis virus liver pathology is dependent on ADP-ribose-1"-phosphatase, a viral function conserved in the alpha-like supergroup. *J. Virol.* **82**, 12325-12334.
- Escors, D., Camafeita, E., Ortego, J., Laude, H., Enjuanes, L., 2001.** Organization of two transmissible gastroenteritis coronavirus membrane protein topologies within the virion and core. *J. Virol.* **75**, 12228-12240.
- Escors, D., Izeta, A., Capiscol, C., Enjuanes, L., 2003.** Transmissible gastroenteritis coronavirus packaging signal is located at the 5' end of the virus genome. *J. Virol.* **77**, 7890-7902.



- Frank, R.**, 2002. The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. *J. Immunol. Methods* **267**, 13-26.
- Frieman, M., Ratia, K., Johnston, R.E., Mesecar, A.D., Baric, R.S.**, 2009. Severe acute respiratory syndrome coronavirus papain-like protease ubiquitin-like domain and catalytic domain regulate antagonism of IRF3 and NF-kappaB signaling. *J. Virol.* **83**, 6689-6705.
- Furtak, V., Mulky, A., Rawlings, S.A., Kozhaya, L., Lee, K., Kewalramani, V.N., Unutmaz, D.**, 2010. Perturbation of the P-body component Mov10 inhibits HIV-1 infectivity. *PLoS One* **5**, e9081.
- Galan, C., Enjuanes, L., Almazan, F.**, 2005. A point mutation within the replicase gene differentially affects coronavirus genome versus minigenome replication. *J. Virol.* **79**, 15016-15026.
- Galan, C., Sola, I., Nogales, A., Thomas, B., Akoulitchiev, A., Enjuanes, L., Almazan, F.**, 2009. Host cell proteins interacting with the 3' end of TGEV coronavirus genome influence virus replication. *Virology* **391**, 304-314.
- Galfre, g., Milstein, C.**, 1981. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures, *in*: Langone, J.J., Van Vunakis, H. (Eds.), *Immunochemical Techniques*. Academic Press, New York, pp. 3-46.
- Gallagher, T.M., Buchmeier, M.J.**, 2001. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology* **279**, 371-374.
- Garcia-Sastre, A.**, 2011. 2 methylate or not 2 methylate: viral evasion of the type I interferon response. *Nat. Immunol.* **12**, 114-115.
- Garwes, D.J., Pocock, D.H.**, 1975. The polypeptide structure of transmissible gastroenteritis virus. *J. Gen. Virol.* **29**, 25-34.
- Geller, R., Vignuzzi, M., Andino, R., Frydman, J.**, 2007. Evolutionary constraints on chaperone-mediated folding provide an antiviral approach refractory to development of drug resistance. *Genes Dev.* **21**, 195-205.
- Ginalski, K., Godzik, A., Rychlewski, L.**, 2006. Novel SARS Unique AdoMet-Dependent Methyltransferase. *Cell Cycle* **5**, 2414-2416.
- Gloza-Rausch, F., Ipsen, A., Seebens, A., Gottsche, M., Panning, M., Felix Drexler, J., Petersen, N., Annan, A., Grywna, K., Muller, M., Pfefferle, S., Drosten, C.**, 2008. Detection and prevalence patterns of group I coronaviruses in bats, northern Germany. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 626-631.
- Goebel, S.J., Hsue, B., Dombrowski, T.F., Masters, P.S.**, 2004a. Characterization of the RNA components of a putative molecular switch in the 3' untranslated region of the murine coronavirus genome. *J. Virol.* **78**, 669-682.
- Goebel, S.J., Taylor, J., Masters, P.S.**, 2004b. The 3' cis-acting genomic replication element of the severe acute respiratory syndrome coronavirus can function in the murine coronavirus genome. *J. Virol.* **78**, 7846-7851.
- Gonzalez, J.M., Gomez-Puertas, P., Cavanagh, D., Gorbalenya, A.E., Enjuanes, L.**, 2003. A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae. *Arch. Virol.* **148**, 2207-2235.
- Gorbalenya, A.E., Enjuanes, L., Ziebuhr, J., Snijder, E.J.**, 2006. Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res.* **117**, 17-37.

- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P., Blinov, V.M.**, 1989. Coronavirus genome: prediction of putative functional domains in the non-structural polyprotein by comparative amino acid sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* **17**, 4847-4861.
- Gorbalenya, A.E., Snijder, E.J., Spaan, W.J.**, 2004. Severe acute respiratory syndrome coronavirus phylogeny: toward consensus. *J. Virol.* **78**, 7863-7866.
- Gosert, R., Kanjanahaluethai, A., Egger, D., Bienz, K., Baker, S.C.**, 2002. RNA replication of mouse hepatitis virus takes place at double-membrane vesicles. *J. Virol.* **76**, 3697-3708.
- Graham, R.L., Denison, M.R.**, 2006. Replication of murine hepatitis virus is regulated by papain-like proteinase 1 processing of nonstructural proteins 1, 2, and 3. *J. Virol.* **80**, 11610-11620.
- Graham, R.L., Sims, A.C., Brockway, S.M., Baric, R.S., Denison, M.R.**, 2005. The nsp2 replicase proteins of murine hepatitis virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus are dispensable for viral replication. *J. Virol.* **79**, 13399-13411.
- Gustin, K.M., Guan, B.J., Dziduszko, A., Brian, D.A.**, 2009. Bovine coronavirus nonstructural protein 1 (p28) is an RNA binding protein that binds terminal genomic cis-replication elements. *J. Virol.* **83**, 6087-6097.
- Hagemeijer, M.C., Verheije, M.H., Ulasli, M., Shaltiel, I.A., de Vries, L.A., Reggiori, F., Rottier, P.J., de Haan, C.A.**, 2010. Dynamics of coronavirus replication-transcription complexes. *J. Virol.* **84**, 2134-2149.
- Hanahan, D.**, 1985. Techniques for transformation of *E. coli*, in: Glover, D.H. (Ed.), DNA Cloning. A Practical Approach. IRL Press Oxford, Oxford, pp. 109-136.
- Hara, H., Aizaki, H., Matsuda, M., Shinkai-Ouchi, F., Inoue, Y., Murakami, K., Shoji, I., Kawakami, H., Matsuura, Y., Lai, M.M., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T.**, 2009. Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J. Virol.* **83**, 5137-5147.
- Harlow, E., Lane, D.**, 1988. Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Hastings, M.L., Allemand, E., Duelli, D.M., Myers, M.P., Krainer, A.R.**, 2007. Control of pre-mRNA splicing by the general splicing factors PUF60 and U2AF(65). *PloS one* **2**, e538.
- Haussecker, D., Cao, D., Huang, Y., Parameswaran, P., Fire, A.Z., Kay, M.A.**, 2008. Capped small RNAs and MOV10 in human hepatitis delta virus replication. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 714-721.
- Havre, P.A., Abe, M., Urasaki, Y., Ohnuma, K., Morimoto, C., Dang, N.H.**, 2008. The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer. *Front. Biosci.* **13**, 1634-1645.
- He, Y., Li, J., Li, W., Lustigman, S., Farzan, M., Jiang, S.**, 2006. Cross-neutralization of human and palm civet severe acute respiratory syndrome coronaviruses by antibodies targeting the receptor-binding domain of spike protein. *J. Immunol.* **176**, 6085-6092.
- Houthaeve, T., Gausepohl, H., Mann, M., Ashman, K.**, 1995. Automation of micropreparation and enzymatic cleavage of gel electrophoretically separated proteins. *FEBS Lett.* **376**, 91-94.

- Hsue, B., Hartshorne, T., Masters, P.S.**, 2000. Characterization of an essential RNA secondary structure in the 3' untranslated region of the murine coronavirus genome. *J. Virol.* **74**, 6911-6921.
- Hsue, B., Masters, P.S.**, 1997. A bulged stem-loop structure in the 3' untranslated region of the genome of the coronavirus mouse hepatitis virus is essential for replication. *J. Virol.* **71**, 7567-7578.
- Huang, C., Ito, N., Tseng, C.T., Makino, S.**, 2006. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 7a accessory protein is a viral structural protein. *J. Virol.* **80**, 7287-7294.
- Huang, C., Peters, C.J., Makino, S.**, 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus accessory protein 6 is a virion-associated protein and is released from 6 protein-expressing cells. *J. Virol.* **81**, 5423-5426.
- Huang, P., Lai, M.M.C.**, 1999. Polypyrimidine tract-binding protein binds to the complementary strand of the mouse hepatitis virus 3' untranslated region, thereby altering RNA conformation. *J. Virol.* **73**, 9110-9116.
- Huang, P., Lai, M.M.C.**, 2001. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 binds to the 3'-untranslated region and mediates potential 5'-3'-end cross talks of mouse hepatitis virus RNA. *J. Virol.* **75**, 5009-5017.
- Huang, Z., Fasco, M.J., Kaminsky, L.S.**, 1996. Optimization of DNase I removal of contaminating DNA from RNA for use in quantitative RNA-PCR. *BioTechniques* **20**, 1012-1020.
- Hurst, K.R., Ye, R., Goebel, S.J., Jayaraman, P., Masters, P.S.**, 2010. An interaction between the nucleocapsid protein and a component of the replicase-transcriptase complex is crucial for the infectivity of coronavirus genomic RNA. *J. Virol.* **84**, 10276-10288.
- Ibba, M., Soll, D.**, 2000. Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 617-650.
- Ikushima, H., Munakata, Y., Ishii, T., Iwata, S., Terashima, M., Tanaka, H., Schlossman, S.F., Morimoto, C.**, 2000. Internalization of CD26 by mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor contributes to T cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8439-8444.
- Imbert, I., Guillemot, J.C., Bourhis, J.M., Bussetta, C., Coutard, B., Egloff, M.P., Ferron, F., Gorbalenya, A.E., Canard, B.**, 2006. A second, non-canonical RNA-dependent RNA polymerase in SARS coronavirus. *EMBO J.* **25**, 4933-4942.
- Imbert, I., Snijder, E.J., Dimitrova, M., Guillemot, J.C., Lecine, P., Canard, B.**, 2008. The SARS-Coronavirus PLnc domain of nsp3 as a replication/transcription scaffolding protein. *Virus Res.* **133**, 136-148.
- Ito, N., Mossel, E.C., Narayanan, K., Popov, V.L., Huang, C., Inoue, T., Peters, C.J., Makino, S.**, 2005. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a protein is a viral structural protein. *J. Virol.* **79**, 3182-3186.
- Ivanov, K.A., Hertzog, T., Rozanov, M., Bayer, S., Thiel, V., Gorbalenya, A.E., Ziebuhr, J.**, 2004a. Major genetic marker of nidoviruses encodes a replicative endoribonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 12694-12699.

- Ivanov, K.A., Thiel, V., Dobbe, J.C., van der Meer, Y., Snijder, E.J., Ziebuhr, J., 2004b.** Multiple enzymatic activities associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus helicase. *J. Virol.* **78**, 5619-5632.
- Izeta, A., Smerdou, C., Alonso, S., Penzes, Z., Mendez, A., Plana-Duran, J., Enjuanes, L., 1999.** Replication and packaging of transmissible gastroenteritis coronavirus-derived synthetic minigenomes. *J. Virol.* **73**, 1535-1545.
- Jacobs, L., Van der Zeijst, B.A.M., Horzinek, M., 1986.** Characterization and translation of transmissible gastroenteritis virus mRNAs. *J. Virol.* **57**, 1010-1015.
- Jeffers, S.A., Tusell, S.M., Gillim-Ross, L., Hemmila, E.M., Achenbach, J.E., Babcock, G.J., Thomas, W.D., Jr., Thackray, L.B., Young, M.D., Mason, R.J., Ambrosino, D.M., Wentworth, D.E., Demartini, J.C., Holmes, K.V., 2004.** CD209L (L-SIGN) is a receptor for severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 15748-15753.
- Jia, J., Arif, A., Ray, P.S., Fox, P.L., 2008.** WHEP domains direct noncanonical function of glutamyl-Prolyl tRNA synthetase in translational control of gene expression. *Mol. Cell.* **29**, 679-690.
- Jimenez, G., Correa, I., Melgosa, M.P., Bullido, M.J., Enjuanes, L., 1986.** Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutralization. *J. Virol.* **60**, 131-139.
- Kamitani, W., Huang, C., Narayanan, K., Lokugamage, K.G., Makino, S., 2009.** A two-pronged strategy to suppress host protein synthesis by SARS coronavirus Nsp1 protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1134-1140.
- Kamitani, W., Narayanan, K., Huang, C., Lokugamage, K., Ikegami, T., Ito, N., Kubo, H., Makino, S., 2006.** Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 protein suppresses host gene expression by promoting host mRNA degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 12885-12890.
- Kang, H., Bhardwaj, K., Li, Y., Palaninathan, S., Sacchettini, J., Guarino, L., Leibowitz, J.L., Kao, C.C., 2007.** Biochemical and genetic analyses of murine hepatitis virus Nsp15 endoribonuclease. *J. Virol.* **81**, 13587-13597.
- Kang, H., Feng, M., Schroeder, M.E., Giedroc, D.P., Leibowitz, J.L., 2006.** Putative cis-acting stem-loops in the 5' untranslated region of the severe acute respiratory syndrome coronavirus can substitute for their mouse hepatitis virus counterparts. *J. Virol.* **80**, 10600-10614.
- Kanjanahaluethai, A., Chen, Z., Jukneliene, D., Baker, S.C., 2007.** Membrane topology of murine coronavirus replicase nonstructural protein 3. *Virology* **361**, 391-401.
- King, B., Potts, B.J., Brian, D.A., 1985.** Bovine coronavirus hemagglutinin protein. *Virus Res.* **2**, 53-59.
- Knoops, K., Kikkert, M., Worm, S.H., Zevenhoven-Dobbe, J.C., van der Meer, Y., Koster, A.J., Mommaas, A.M., Snijder, E.J., 2008.** SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol.* **6**, e226.
- Koegl, M., Uetz, P., 2007.** Improving yeast two-hybrid screening systems. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* **6**, 302-312.

- Kohl, R.J., Hall, T.C.**, 1974. Aminoacylation of RNA from several viruses: amino acid specificity and differential activity of plant, yeast and bacterial synthetases. *J. Gen. Virol.* **25**, 257-261.
- Kong, Q., Xue, C., Ren, X., Zhang, C., Li, L., Shu, D., Bi, Y., Cao, Y.**, 2010. Proteomic analysis of purified coronavirus infectious bronchitis virus particles. *Proteome Sci.* **8**, 29.
- Koonin, E.V.**, 1991. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.* **72**, 2197-2206.
- Kremer, L., Marquez, G.**, 2004. Generation of monoclonal antibodies against chemokine receptors. *Methods Mol. Biol.* **239**, 243.
- Kuo, L., Masters, P.S.**, 2003. The small envelope protein E is not essential for murine coronavirus replication. *J. Virol.* **77**, 4597-4608.
- Kuri, T., Eriksson, K.K., Putics, A., Zust, R., Snijder, E.J., Davidson, A.D., Siddell, S.G., Thiel, V., Ziebuhr, J., Weber, F.**, 2011. The ADP-ribose-1"-monophosphatase domains of severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus 229E mediate resistance to antiviral interferon responses. *J. Gen. Virol.* **92**, 1899-1905.
- Laemmli, U.K.**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lai, M.M.C.**, 1998. Cellular factors in the transcription and replication of viral RNA genomes: a parallel to DNA-dependent RNA transcription. *Virology* **244**, 1-12.
- Lamesch, P., Li, N., Milstein, S., Fan, C., Hao, T., Szabo, G., Hu, Z., Venkatesan, K., Bethel, G., Martin, P., Rogers, J., Lawlor, S., McLaren, S., Dricot, A., Borick, H., Cusick, M.E., Vandenhaute, J., Dunham, I., Hill, D.E., Vidal, M.**, 2007. hORFeome v3.1: a resource of human open reading frames representing over 10,000 human genes. *Genomics* **89**, 307-315.
- Li, H.P., Huang, P., Park, S., Lai, M.M.C.**, 1999. Polypyrimidine tract-binding protein binds to the leader RNA of mouse hepatitis virus and serves as a regulator of viral transcription. *J. Virol.* **73**, 772-777.
- Li, H.P., Zhang, X., Duncan, R., Comai, L., Lai, M.M.C.**, 1997. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 binds to the transcription-regulatory region of mouse hepatitis virus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9544-9549.
- Li, L., Kang, H., Liu, P., Makkinje, N., Williamson, S.T., Leibowitz, J.L., Giedroc, D.P.**, 2008. Structural lability in stem-loop 1 drives a 5' UTR-3' UTR interaction in coronavirus replication. *J. Mol. Biol.* **377**, 790-803.
- Li, W., Moore, M.J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S.K., Berne, M.A., Somasundaran, M., Sullivan, J.L., Luzuriaga, K., Greenough, T.C., Choe, H., Farzan, M.**, 2003. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for de SARS coronavirus. *Nature* **426**, 450-454.
- Lin, Y.J., Lai, M.M.C.**, 1993. Deletion mapping of a mouse hepatitis virus defective interfering RNA reveals the requirement of an internal and discontinuous sequence for replication. *J. Virol.* **67**, 6110-6118.

- Lin, Y.J., Liao, C.L., Lai, M.M.C.**, 1994. Identification of the cis-acting signal for minus-strand RNA synthesis of a murine coronavirus: implications for the role of minus-strand RNA in RNA replication and transcription. *J. Virol.* **68**, 8131-8140.
- Liu, P., Li, L., Keane, S.C., Yang, D., Leibowitz, J.L., Giedroc, D.P.**, 2009. Mouse hepatitis virus stem-loop 2 adopts a uYNMG(U)a-like tetraloop structure that is highly functionally tolerant of base substitutions. *J. Virol.* **83**, 12084-12093.
- Liu, P., Li, L., Millership, J.J., Kang, H., Leibowitz, J.L., Giedroc, D.P.**, 2007. A U-turn motif-containing stem-loop in the coronavirus 5' untranslated region plays a functional role in replication. *RNA* **13**, 763-780.
- Liu, Q., Johnson, R.F., Leibowitz, J.L.**, 2001. Secondary structural elements within the 3' untranslated region of mouse hepatitis virus strain JHM genomic RNA. *J. Virol.* **75**, 12105-12113.
- Luckow, V.A., Lee, S.C., Barry, G.F., Olins, P.O.**, 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J. Virol.* **67**, 4566-4579.
- Lunney, J.K., Benfield, D.A., Rowland, R.R.**, 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: an update on an emerging and re-emerging viral disease of swine. *Virus Res.* **154**, 1-6.
- Luytjes, W., Gerritsma, H., Spaan, W.J.M.**, 1996. Replication of synthetic defective interfering RNAs derived from coronavirus mouse hepatitis virus-A59. *Virology* **216**, 174-183.
- Maggioni, C., Braakman, I.**, 2005. Synthesis and quality control of viral membrane proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **285**, 175-198.
- Makino, S., Fujioka, N., Fujiwara, K.**, 1985. Structure of the intracellular viral RNAs of defective interfering particles of mouse hepatitis virus. *J. Virol.* **54**, 329-336.
- Makino, S., Shieh, C.K., Keck, J.G., Lai, M.M.C.**, 1988. Defective-interfering particles of murine coronaviruses: mechanism of synthesis of defective viral RNAs. *Virology* **163**, 104-111.
- Makino, S., Yokomori, K., Lai, M.M.C.**, 1990. Analysis of efficiently packaged defective interfering RNAs of murine coronavirus: localization of a possible RNA-packaging signal. *J. Virol.* **64**, 6045-6053.
- Martín-Alonso, J.M., Balbín, M., Garwes, D.J., Enjuanes, L., Gascón, S., Parra, F.**, 1992. Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus nucleoprotein. *Virology* **188**, 168 - 174.
- Masters, P.S.**, 1999. Reverse genetics of the largest RNA viruses. *Adv. Virus Res.* **53**, 245-264.
- Masters, P.S.**, 2006. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* **66**, 193-292.
- Matthes, N., Mesters, J.R., Coutard, B., Canard, B., Snijder, E.J., Moll, R., Hilgenfeld, R.**, 2006. The non-structural protein Nsp10 of mouse hepatitis virus binds zinc ions and nucleic acids. *FEBS Lett.* **580**, 4143-4149.
- Mayer, M.P.**, 2005. Recruitment of Hsp70 chaperones: a crucial part of viral survival strategies. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **153**, 1-46.

- McClurkin, A.W., Norman, J.O.**, 1966. Studies on transmissible gastroenteritis of swine. II. Selected characteristics of a cytopathogenic virus common to five isolates from transmissible gastroenteritis. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* **30**, 190-198.
- McIntosh, K., Kapikian, A.Z., Hardison, K.A., Hartley, J.W., Chanock, R.M.**, 1969. Antigenic relationships among the coronaviruses of man and between human and animal coronaviruses. *J. Immunol.* **102**, 1109-1118.
- Meister, G., Landthaler, M., Peters, L., Chen, P.Y., Urlaub, H., Luhrmann, R., Tuschl, T.**, 2005. Identification of novel argonaute-associated proteins. *Curr. Biol.* **15**, 2149-2155.
- Méndez, A., Smerdou, C., Izeta, A., Gebauer, F., Enjuanes, L.**, 1996. Molecular characterization of transmissible gastroenteritis coronavirus defective interfering genomes: packaging and heterogeneity. *Virology* **217**, 495-507.
- Miknis, Z.J., Donaldson, E.F., Umland, T.C., Rimmer, R.A., Baric, R.S., Schultz, L.W.**, 2009. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp9 dimerization is essential for efficient viral growth. *J. Virol.* **83**, 3007-3018.
- Minskaia, E., Hertzog, T., Gorbalenya, A.E., Campanacci, V., Cambillau, C., Canard, B., Ziebuhr, J.**, 2006. Discovery of an RNA virus 3'->5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 5108-5113.
- Myint, S.H.**, 1995. Human coronavirus infections, *in*: Siddell, S.G. (Ed.), The coronaviridae. Plenum press, New York, pp. 389-398.
- Nakagawa, S., Umehara, T., Matsuda, C., Kuge, S., Sudoh, M., Kohara, M.**, 2007. Hsp90 inhibitors suppress HCV replication in replicon cells and humanized liver mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **353**, 882-888.
- Nanda, S.K., Johnson, R.F., Liu, Q., Leibowitz, J.L.**, 2004. Mitochondrial HSP70, HSP40, and HSP60 bind to the 3' untranslated region of the Murine hepatitis virus genome. *Arch. Virol.* **149**, 93-111.
- Nanda, S.K., Leibowitz, J.L.**, 2001. Mitochondrial aconitase binds to the 3' untranslated region of the mouse hepatitis virus genome. *J. Virol.* **75**, 3352-3362.
- Narayanan, K., Huang, C., Lokugamage, K., Kamitani, W., Ikegami, T., Tseng, C.T., Makino, S.**, 2008. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 suppresses host gene expression, including that of type I interferon, in infected cells. *J. Virol.* **82**, 4471-4479.
- Narayanan, K., Makino, S.**, 2001. Cooperation of an RNA packaging signal and a viral envelope protein in coronavirus RNA Packaging. *J. Virol.* **75**, 9059-9067.
- Neuman, B.W., Joseph, J.S., Saikatendu, K.S., Serrano, P., Chatterjee, A., Johnson, M.A., Liao, L., Klaus, J.P., Yates, J.R., 3rd, Wuthrich, K., Stevens, R.C., Buchmeier, M.J., Kuhn, P.**, 2008. Proteomics analysis unravels the functional repertoire of coronavirus nonstructural protein 3. *J. Virol.* **82**, 5279-5294.
- Ng, M.L., Tan, S.H., See, E.E., Ooi, E.E., Ling, A.E.**, 2003. Proliferative growth of SARS coronavirus in Vero E6 cells. *J. Gen. Virol.* **84**, 3291-3303.

- Nga, P.T., Parquet Mdel, C., Lauber, C., Parida, M., Nabeshima, T., Yu, F., Thuy, N.T., Inoue, S., Ito, T., Okamoto, K., Ichinose, A., Snijder, E.J., Morita, K., Gorbalenya, A.E., 2011.** Discovery of the first insect nidovirus, a missing evolutionary link in the emergence of the largest RNA virus genomes. *PLoS Pathog.* **7**, e1002215.
- Nieto-Torres, J.L., Dediego, M.L., Alvarez, E., Jimenez-Guardeno, J.M., Regla-Nava, J.A., Llorente, M., Kremer, L., Shuo, S., Enjuanes, L., 2011.** Subcellular location and topology of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein. *Virology* **415**, 69-82.
- Nogales, A., Galan, C., Marquez-Jurado, S., Garcia-Gallo, M., Kremer, L., Enjuanes, L., Almazan, F., 2011.** Immunogenic characterization and epitope mapping of transmissible gastroenteritis virus RNA dependent RNA polymerase. *J. Virol. Methods* **175**, 7-13.
- Nogales, A., Marquez-Jurado, S., Galan, C., Enjuanes, L., Almazan, F., 2012.** Transmissible gastroenteritis coronavirus RNA-dependent RNA polymerase and nonstructural proteins 2, 3, and 8 are incorporated into viral particles. *J. Virol.* **86**, 1261-1266.
- Novoa, R.R., Calderita, G., Arranz, R., Fontana, J., Granzow, H., Risco, C., 2005.** Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol. Cell* **97**, 147-142.
- O'Reilly, E.K., Paul, J.D., Kao, C., 1997.** Analysis of the interaction of viral RNA replication proteins by using the yeast two-hybrid assay. *J. Virol.* **71**, 7526-7532.
- Ohta, A., Nishiyama, Y., 2011.** Mitochondria and viruses. *Mitochondrion* **11**, 1-12.
- Okamoto, T., Nishimura, Y., Ichimura, T., Suzuki, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Moriishi, K., Matsuura, Y., 2006.** Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J.* **25**, 5015-5025.
- Oostra, M., Hagemeijer, M.C., van Gent, M., Bekker, C.P., te Lintelo, E.G., Rottier, P.J., de Haan, C.A., 2008.** Topology and membrane anchoring of the coronavirus replication complex: not all hydrophobic domains of nsp3 and nsp6 are membrane spanning. *J. Virol.* **82**, 12392-12405.
- Oostra, M., te Lintelo, E.G., Deijis, M., Verheije, M.H., Rottier, P.J., de Haan, C.A., 2007.** Localization and membrane topology of coronavirus nonstructural protein 4: involvement of the early secretory pathway in replication. *J. Virol.* **81**, 12323-12336.
- Ortego, J., Ceriani, J.E., Patino, C., Plana, J., Enjuanes, L., 2007.** Absence of E protein arrests transmissible gastroenteritis coronavirus maturation in the secretory pathway. *Virology* **368**, 296-308.
- Ortego, J., Escors, D., Laude, H., Enjuanes, L., 2002.** Generation of a replication-competent, propagation-deficient virus vector based on the transmissible gastroenteritis coronavirus genome. *J. Virol.* **76**, 11518-11529.
- Ozato, K., Shin, D.M., Chang, T.H., Morse, H.C., 3rd, 2008.** TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 849-860.
- Page, K.W., Britton, P., Bournsnel, M.E.G., 1990.** Sequence analysis of the leader RNA of two porcine coronaviruses: transmissible gastroenteritis coronavirus and porcine respiratory coronavirus. *Virus Genes* **4**, 289-301.



- Page-McCaw, P.S., Amonlirdviman, K., Sharp, P.A.**, 1999. PUF60: a novel U2AF65-related splicing activity. *RNA* **5**, 1548-1560.
- Pasternak, A.O., Spaan, W.J., Snijder, E.J.**, 2006. Nidovirus transcription: how to make sense? *J. Gen. Virol.* **87**, 1403-1421.
- Pasternak, A.O., van den Born, E., Spaan, W.J., Snijder, E.J.**, 2001. Sequence requirements for RNA strand transfer during nidovirus discontinuous subgenomic RNA synthesis. *EMBO J.* **20**, 7220-7228.
- Pensaert, M., Van Reeth, K.**, 1998. Porcine epidemic diarrhea and porcine respiratory coronavirus. *Proc. Ame. Ass. Swi. Pract.*, 433-436.
- Penzes, Z., Gonzalez, J.M., Calvo, E., Izeta, A., Smerdou, C., Mendez, A., Sanchez, C.M., Sola, I., Almazan, F., Enjuanes, L.**, 2001. Complete genome sequence of transmissible gastroenteritis coronavirus PUR46-MAD clone and evolution of the purdue virus cluster. *Virus Genes* **23**, 105-118.
- Penzes, Z., Tibbles, K., Shaw, K., Britton, P., Brown, T.D.K., Cavanagh, D.**, 1994. Characterization of a replicating and packaged defective RNA of avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology* **203**, 286-293.
- Perlman, S., Lane, T.E., Buchmeier, M.J.**, 2000. Coronavirus: hepatitis, peritonitis, and central nervous system disease, *in*: Cunningham, M.W., Fujinami, R.S. (Eds.), Effects of microbes on the immune system. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 331-348.
- Pettit Kneller, E.L., Connor, J.H., Lyles, D.S.**, 2009. hnRNPs Relocalize to the cytoplasm following infection with vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* **83**, 770-780.
- Pike, B.V., Garwes, D.J.**, 1977. Lipids of transmissible gastroenteritis virus and their relation to those of two different host cells. *J. Gen. Virol.* **34**, 531-535.
- Posthuma, C.C., Nedialkova, D.D., Zevenhoven-Dobbe, J.C., Blokhuis, J.H., Gorbalenya, A.E., Snijder, E.J.**, 2006. Site-directed mutagenesis of the Nidovirus replicative endoribonuclease NendoU exerts pleiotropic effects on the arterivirus life cycle. *J. Virol.* **80**, 1653-1661.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., Seraphin, B.**, 2001. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**, 218-229.
- Raman, S., Bouma, P., Williams, G.D., Brian, D.A.**, 2003. Stem-loop III in the 5' untranslated region is a cis-acting element in bovine coronavirus defective interfering RNA replication. *J. Virol.* **77**, 6720-6730.
- Raman, S., Brian, D.A.**, 2005. Stem-loop IV in the 5' untranslated region is a cis-acting element in bovine coronavirus defective interfering RNA replication. *J. Virol.* **79**, 12434-12446.
- Reggiori, F., Monastyrska, I., Verheije, M.H., Cali, T., Ulasli, M., Bianchi, S., Bernasconi, R., de Haan, C.A., Molinari, M.**, 2010. Coronaviruses Hijack the LC3-I-positive EDEMosomes, ER-derived vesicles exporting short-lived ERAD regulators, for replication. *Cell Host Microbe* **7**, 500-508.

- Renzi, F., Caffarelli, E., Laneve, P., Bozzoni, I., Brunori, M., Vallone, B.**, 2006. The structure of the endoribonuclease XendoU: From small nucleolar RNA processing to severe acute respiratory syndrome coronavirus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 12365-12370.
- Repass, J.F., Makino, S.**, 1998. Importance of the positive-strand RNA secondary structure of a murine coronavirus defective interfering RNA internal replication signal in positive-strand RNA synthesis. *J. Virol.* **72**, 7926-7933.
- Ricagno, S., Egloff, M.P., Ulferts, R., Coutard, B., Nurizzo, D., Campanacci, V., Cambillau, C., Ziebuhr, J., Canard, B.**, 2006. Crystal structure and mechanistic determinants of SARS coronavirus nonstructural protein 15 define an endoribonuclease family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 11892-11897.
- Risco, C., Antón, I.M., Enjuanes, L., Carrascosa, J.L.**, 1996. The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins. *J. Virol.* **70**, 4773-4777.
- Rodriguez, M.J., Sarraseca, J., Fominaya, J., Cortes, E., Sanz, A., Casal, J.I.**, 2001. Identification of an immunodominant epitope in the C terminus of glycoprotein 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* **82**, 995-999.
- Rota, P.A., Oberste, M.S., Monroe, S.S., Nix, W.A., Campganoli, R., Icenogle, J.P., Peñaranda, S., Bankamp, B., Maher, K., Chen, M.-H., Tong, S., Tamin, A., Lowe, L., Frace, M., DeRisi, J.L., Chen, Q., Wang, D., Erdman, D.d., Peret, T.C.T., Burns, C., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Sanchez, A., Liffick, S., Holloway, B., Limor, J., McCaustland, K., Olsen-Rassmussen, M., Fouchier, R., Gunther, S., Osterhaus, A.D.M.E., Drosten, C., Pallansch, M.A., Anderson, L.J., Bellini, W.J.**, 2003. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* **300**, 1394-1399.
- Saif, L.J., Wesley, R.D.**, 1992. Transmissible gastroenteritis, *in*: Leman, A.D., Straw, B.E., Mengeling, W.L., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.), *Diseases of Swine*, 7th ed. Wolfe Publishing Ltd, Ames. Iowa, pp. 362-386.
- Saikatendu, K.S., Joseph, J.S., Subramanian, V., Clayton, T., Griffith, M., Moy, K., Velasquez, J., Neuman, B.W., Buchmeier, M.J., Stevens, R.C., Kuhn, P.**, 2005. Structural basis of severe acute respiratory syndrome coronavirus ADP-ribose-1"-phosphate dephosphorylation by a conserved domain of nsP3. *Structure* **13**, 1665-1675.
- Salanueva, I.J., Carrascosa, J.L., Risco, C.**, 1999. Structural maturation of the transmissible gastroenteritis coronavirus. *J. Virol.* **73**, 7952-7964.
- Sambrook, J., Russell, D.W.**, 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sampath, P., Mazumder, B., Seshadri, V., Gerber, C.A., Chavatte, L., Kinter, M., Ting, S.M., Dignam, J.D., Kim, S., Driscoll, D.M., Fox, P.L.**, 2004. Noncanonical function of glutamyl-prolyl-tRNA synthetase: gene-specific silencing of translation. *Cell* **119**, 195-208.
- Sanchez, C.M., Izeta, A., Sánchez-Morgado, J.M., Alonso, S., Sola, I., Balasch, M., Plana-Duran, J., Enjuanes, L.**, 1999. Targeted recombination demonstrates that the spike gene of transmissible gastroenteritis coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence. *J. Virol.* **73**, 7607-7618.

- Sanchez, C.M., Jiménez, G., Laviada, M.D., Correa, I., Suñe, C., Bullido, M.J., Gebauer, F., Smerdou, C., Callebaut, P., Escribano, J.M., Enjuanes, L., 1990.** Antigenic homology among coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus. *Virology* **174**, 410-417.
- Sawicki, S.G., Sawicki, D.L., 1990.** Coronavirus transcription: subgenomic mouse hepatitis virus replicative intermediates function in RNA synthesis. *J. Virol.* **64**, 1050-1056.
- Sawicki, S.G., Sawicki, D.L., 1998.** A new model for coronavirus transcription. *Adv. Exp. Med. Biol.* **440**, 215-219.
- Sawicki, S.G., Sawicki, D.L., 2005.** Coronavirus transcription: a perspective. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **287**, 31-55.
- Sawicki, S.G., Sawicki, D.L., Siddell, S.G., 2007.** A contemporary view of coronavirus transcription. *J. Virol.* **81**, 20-29.
- Schaecher, S.R., Mackenzie, J.M., Pekosz, A., 2007.** The ORF7b protein of SARS-CoV is expressed in virus-infected cells and incorporated into SARS-CoV particles. *J. Virol.* **81**, 718-731.
- Schelle, B., Karl, N., Ludewig, B., Siddell, S.G., Thiel, V., 2005.** Selective replication of coronavirus genomes that express nucleocapsid protein. *J. Virol.* **79**, 6620-6630.
- Schiller, J.J., Kanjanahaluethai, A., Baker, S.c., 1998.** Processing of the coronavirus MHV-JHM polymerase polyprotein: identification of precursors and proteolytic products spanning 400 kilodaltons of ORF1a. *Virology* **242**, 288-302.
- Serrano, P., Johnson, M.A., Almeida, M.S., Horst, R., Herrmann, T., Joseph, J.S., Neuman, B.W., Subramanian, V., Saikatendu, K.S., Buchmeier, M.J., Stevens, R.C., Kuhn, P., Wuthrich, K., 2007.** Nuclear magnetic resonance structure of the N-terminal domain of nonstructural protein 3 from the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* **81**, 12049-12060.
- Seybert, A., Hegyi, A., Siddell, S.G., Ziebuhr, J., 2000a.** The human coronavirus 229E superfamily 1 helicase has RNA and DNA duplex-unwinding activities with 5'-to-3' polarity. *RNA* **6**, 1056-1068.
- Shen, S., Lin, P.S., Chao, Y.C., Zhang, A., Yang, X., Lim, S.G., Hong, W., Tan, Y.J., 2005.** The severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a is a novel structural protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 286-292.
- Shi, S.T., Huang, P., Li, H.P., Lai, M.M.C., 2000.** Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 regulates RNA synthesis of a cytoplasmic virus. *EMBO J.* **19**, 4701-4711.
- Shi, S.T., Lai, M.M., 2005.** Viral and cellular proteins involved in coronavirus replication, *in*: Enjuanes, L. (Ed.), *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, pp. 95-131.
- Shi, S.T., Schiller, J.J., Kanjanahaluethai, A., Baker, S.C., Oh, J.W., Lai, M.M.C., 1999.** Colocalization and membrane association of murine hepatitis virus gene 1 products and de novo-synthesized viral RNA in infected cells. *J. Virol.* **73**, 5957-5969.

- Shimono, Y., Murakami, H., Kawai, K., Wade, P.A., Shimokata, K., Takahashi, M.,** 2003. Mi-2 beta associates with BRG1 and RET finger protein at the distinct regions with transcriptional activating and repressing abilities. *J. Biol. Chem.* **278**, 51638-51645.
- Siddell, S.G., Sawicki, D., Meyer, Y., Thiel, V., Sawicki, S.,** 2001. Identification of the mutations responsible for the phenotype of three MHV RNA-negative ts mutants. *Adv. Exp. Med. Biol.* **494**, 453-458.
- Sims, A.C., Ostermann, J., Denison, M.R.,** 2000. Mouse hepatitis virus replicase proteins associate with two distinct populations of intracellular membranes. *J. Virol.* **74**, 5647-5654.
- Snijder, E.J., Bredenbeek, P.J., Dobbe, J.C., Thiel, V., Ziebuhr, J., Poon, L.L.M., Guan, Y., Rozanov, M., Spaan, W.J.M., Gorbalenya, A.E.,** 2003. Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J. Mol. Biol.* **331**, 991-1004.
- Snijder, E.J., Spaan, W.J.M.,** 1995. The coronaviruslike superfamily, *in*: Siddell, S.G. (Ed.), *The Coronaviridae*. Plenum press, New York, pp. 239-252.
- Snijder, E.J., van der Meer, Y., Zevenhoven-Dobbe, J., Onderwater, J.J., van der Meulen, J., Koerten, H.K., Mommaas, A.M.,** 2006. Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex. *J. Virol.* **80**, 5927-5940.
- Sola, I., Galan, C., Mateos-Gomez, P.A., Palacio, L., Zuniga, S., Cruz, J.L., Almazan, F., Enjuanes, L.,** 2011a. The polypyrimidine tract-binding protein affects coronavirus RNA accumulation levels and relocalizes viral RNAs to novel cytoplasmic domains different from replication-transcription sites. *J. Virol.* **85**, 5136-5149.
- Sola, I., Mateos-Gomez, P.A., Almazan, F., Zuniga, S., Enjuanes, L.,** 2011b. RNA-RNA and RNA-protein interactions in coronavirus replication and transcription. *RNA Biol.* **8**, 237-248.
- Sola, I., Moreno, J.L., Zuñiga, S., Alonso, S., Enjuanes, L.,** 2005. Role of nucleotides immediately flanking the transcription-regulating sequence core in coronavirus subgenomic mRNA synthesis. *J. Virol.* **79**, 2506-2516.
- Spagnolo, J.F., Hogue, B.G.,** 2000. Host protein interactions with the 3' end of bovine coronavirus RNA and the requirement of the poly(A) tail for coronavirus defective genome replication. *J. Virol.* **74**, 5053-5065.
- St-Jean, J.R., Desforges, M., Almazan, F., Jacomy, H., Enjuanes, L., Talbot, P.J.,** 2006. Recovery of a neurovirulent human coronavirus OC43 from an infectious cDNA clone. *J. Virol.* **80**, 3670-3674.
- Stalcup, R.P., Baric, R.S., Leibowitz, J.L.,** 1998. Genetic complementation among three panels of mouse hepatitis virus gene 1 mutants. *Virology* **241**, 112-121.
- Stertz, S., Reichelt, M., Spiegel, M., Kuri, T., Martinez-Sobrido, L., Garcia-Sastre, A., Weber, F., Kochs, G.,** 2007. The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus. *Virology* **361**, 304-315.
- Sturman, L.S., Holmes, K.V., Behnke, J.,** 1980. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. *J. Virol.* **33**, 449-462.

- Sturman, L.S., V., H.K.**, 1977. Characterization of a coronavirus. II. Glycoproteins of the viral envelope: tryptic peptide analysis. *Virology* **77**, 650-660.
- Suratane, A., Rebhan, I., Matula, P., Kumar, A., Kaderali, L., Rohr, K., Bartenschlager, R., Eils, R., Konig, R.**, 2010. Detecting host factors involved in virus infection by observing the clustering of infected cells in siRNA screening images. *Bioinformatics* **26**, i653-658.
- Sutton, G., Fry, E., Carter, L., Sainsbury, S., Walter, T., Nettleship, J., Berrow, N., Owens, R., Gilbert, R., Davidson, A., Siddell, S., Poon, L.L., Diprose, J., Alderton, D., Walsh, M., Grimes, J.M., Stuart, D.I.**, 2004. The nsp9 replicase protein of SARS-coronavirus, structure and functional insights. *Structure* **12**, 341-353.
- Tai, A.W., Benita, Y., Peng, L.F., Kim, S.S., Sakamoto, N., Xavier, R.J., Chung, R.T.**, 2009. A functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication. *Cell Host Microbe* **5**, 298-307.
- Tan, J., Vonnrhein, C., Smart, O.S., Bricogne, G., Bollati, M., Kusov, Y., Hansen, G., Mesters, J.R., Schmidt, C.L., Hilgenfeld, R.**, 2009. The SARS-unique domain (SUD) of SARS coronavirus contains two macrodomains that bind G-quadruplexes. *PLoS Pathog.* **5**, e1000428.
- te Velthuis, A.J., Arnold, J.J., Cameron, C.E., van den Worm, S.H., Snijder, E.J.**, 2010. The RNA polymerase activity of SARS-coronavirus nsp12 is primer dependent. *Nucleic Acids Res.* **38**, 203-214.
- Thiel, V., Herold, J., Schelle, B., Siddell, S.**, 2001a. Infectious RNA transcribed *in vitro* from a cDNA copy of the human coronavirus genome cloned in vaccinia virus. *J. Gen. Virol.* **82**, 1273-1281.
- Thiel, V., Herold, J., Schelle, B., Siddell, S.G.**, 2001b. Viral replicase gene products suffice for coronavirus discontinuous transcription. *J. Virol.* **75**, 6676-6681.
- Thiel, V., Ivanov, K.A., Putics, A., Hertzog, T., Schelle, B., Bayer, S., Wessbrich, B., Snijder, E.J., Rabenau, H., Doerr, H.W., Gorbalenya, A.E., Ziebuhr, J.**, 2003a. Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J. Gen. Virol.* **84**, 2305-2315.
- Thiel, V., Karl, N., Schelle, B., Disterer, P., Klagge, I., Siddell, S.G.**, 2003b. Multigene RNA vector based on coronavirus transcription. *J. Virol.* **77**, 9790-9798.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J.**, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- Tijms, M.A., Snijder, E.J.**, 2003. Equine arteritis virus non-structural protein 1, an essential factor for viral subgenomic mRNA synthesis, interacts with the cellular transcription co-factor p100. *J. Gen. Virol.* **84**, 2317-2322.
- Tohya, Y., Narayanan, K., Kamitani, W., Huang, C., Lokugamage, K., Makino, S.**, 2009. Suppression of host gene expression by nsp1 proteins of group 2 bat coronaviruses. *J. Virol.* **83**, 5282-5288.

- Tong, S., Conrardy, C., Ruone, S., Kuzmin, I.V., Guo, X., Tao, Y., Niezgoda, M., Haynes, L., Agwanda, B., Breiman, R.F., Anderson, L.J., Rupprecht, C.E.**, 2009. Detection of novel SARS-like and other coronaviruses in bats from Kenya. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 482-485.
- Tooze, J., Tooze, S., Warren, G.**, 1984. Replication of coronavirus MHV-A59 in sac-cells: determination of the first site of budding of progeny virions. *Eur. J. Cell. Biol.* **33**, 281-294.
- Traggiai, E., Becker, S., Subbarao, K., Kolesnikova, L., Uematsu, Y., Gismondo, M.R., Murphy, B.R., Rappuoli, R., Lanzavecchia, A.**, 2004. An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat. Med.* **10**, 871-875.
- van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M.F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R.J., Wolthers, K.C., Wertheim-van Dillen, P.M., Kaandorp, J., Spaargaren, J., Berkhout, B.**, 2004. Identification of a new human coronavirus. *Nat. Med.* **10**, 368-373.
- van der Most, R.G., Bredenbeek, P.J., Spaan, W.J.M.**, 1991. A domain at the 3' end of the polymerase gene is essential for encapsidation of coronavirus defective interfering RNAs. *J. Virol.* **65**, 3219-3226.
- van der Most, R.G., Spaan, W.J.M.**, 1995. Coronavirus replication, transcription, and RNA recombination, *in*: Siddell, S.G. (Ed.), The Coronaviridae. Plenum Press, New York, pp. 11-31.
- van Hemert, M.J., de Wilde, A.H., Gorbalenya, A.E., Snijder, E.J.**, 2008a. The in vitro RNA synthesizing activity of the isolated arterivirus replication/transcription complex is dependent on a host factor. *J. Biol. Chem.* **283**, 16525-16536.
- van Hemert, M.J., van den Worm, S.H., Knoops, K., Mommaas, A.M., Gorbalenya, A.E., Snijder, E.J.**, 2008b. SARS-coronavirus replication/transcription complexes are membrane-protected and need a host factor for activity in vitro. *PLoS Pathog.* **4**, e1000054.
- van Marle, G., Dobbe, J.C., Gultyaev, A.P., Luytjes, W., Spaan, W.J.M., Snijder, E.J.**, 1999. Arterivirus discontinuous mRNA transcription is guided by base pairing between sense and antisense transcription-regulating sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 12056-12061.
- Vazquez, A.L., Martin Alonso, J.M., Casais, R., Boga, J.A., Parra, F.**, 1998. Expression of enzymatically active rabbit hemorrhagic disease virus RNA-dependent RNA polymerase in Escherichia coli. *J. Virol.* **72**, 2999-3004.
- Verdia-Baguena, C., Nieto-Torres, J.L., Queralt-Martin, M., Alcaraz, A., DeDiego, M.L., Enjuanes, L., Aguilera, V.**, 2012. E protein ion channel preference is associated to the polarity of the phospholipid bilayers. *Virology*, Submitted.
- Villordo, S.M., Gamarnik, A.V.**, 2009. Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. *Virus Res.* **139**, 230-239.
- von Grotthuss, M., Wyrwicz, L.S., Rychlewski, L.**, 2003. mRNA cap-1 methyltransferase in the SARS genome. *Cell* **113**, 701-702.

- Walker, P.J., Bonami, J.R., Boonsaeng, V., Chang, P.S., Cowley, J.A., Enjuanes, L., Flegel, T.W., Lightner, D.V., Loh, P.C., Snijder, E.J., Tang, K.**, 2005. *Roniviridae*, in: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, California, pp. 975-979.
- Wang, K., Boysen, C., Shizuya, H., Simon, M.I., Hood, L.**, 1997. Complete nucleotide sequence of two generations of a bacterial artificial chromosome cloning vector. *BioTechniques* **23**, 992-994.
- Wang, R.Y., Nagy, P.D.**, 2008. Tomato bushy stunt virus co-opts the RNA-binding function of a host metabolic enzyme for viral genomic RNA synthesis. *Cell Host Microbe* **3**, 178-187.
- Wang, X., Han, Y., Dang, Y., Fu, W., Zhou, T., Ptak, R.G., Zheng, Y.H.**, 2010. Moloney leukemia virus 10 (MOV10) protein inhibits retrovirus replication. *J. Biol. Chem.* **285**, 14346-14355.
- Wathelet, M.G., Orr, M., Frieman, M.B., Baric, R.S.**, 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus evades antiviral signaling: role of nsp1 and rational design of an attenuated strain. *J. Virol.* **81**, 11620-11633.
- Williams, G.D., Chang, R.-Y., Brian, D.A.**, 1999. A phylogenetically conserved hairpin-type 3' untranslated region pseudoknot functions in coronavirus RNA replication. *J. Virol.* **73**, 8349-8355.
- Wilson, L., Gage, P., Ewart, G.**, 2006a. Hexamethylene amiloride blocks E protein ion channels and inhibits coronavirus replication. *Virology* **353**, 294-306.
- Wilson, L., Gage, P., Ewart, G.**, 2006b. Validation of coronavirus E proteins ion channels as targets for antiviral drugs, in: Perlman, S., Holmes, K. (Eds.), *The Nidovirus: Towards control of SARS and other nidovirus diseases*. Springer, New York, pp. 573-578.
- Wilson, L., McKinlay, C., Gage, P.**, 2004. SARS coronavirus E protein forms cation-selective ion channels. *Virology* **330**, 322-331.
- Wong, S.K., Li, W., Moore, M.J., Choe, H., Farzan, M.**, 2004. A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. *J. Biol. Chem.* **279**, 3197-3201.
- Woo, P.C., Lau, S.K., Chu, C.M., Chan, K.H., Tsoi, H.W., Huang, Y., Wong, B.H., Poon, R.W., Cai, J.J., Luk, W.K., Poon, L.L., Wong, S.S., Guan, Y., Peiris, J.S., Yuen, K.Y.**, 2005. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J. Virol.* **79**, 884-895.
- Woo, P.C., Wang, M., Lau, S.K., Xu, H., Poon, R.W., Guo, R., Wong, B.H., Gao, K., Tsoi, H.W., Huang, Y., Li, K.S., Lam, C.S., Chan, K.H., Zheng, B.J., Yuen, K.Y.**, 2007. Comparative analysis of twelve genomes of three novel group 2c and group 2d coronaviruses reveals unique group and subgroup features. *J. Virol.* **81**, 1574-1585.
- Woods, R.D., Wesley, R.D.**, 1998. Transmissible gastroenteritis coronavirus carrier sow. *Adv. Exp. Med. Biol.* **440**, 641-648.

- Wu, H.Y., Guy, J.S., Yoo, D., Vlasak, R., Urbach, E., Brian, D.A.**, 2003. Common RNA replication signals exist among group 2 coronaviruses: evidence for in vivo recombination between animal and human coronavirus molecules. *Virology* **315**, 174-183.
- Xu, L., Khadijah, S., Fang, S., Wang, L., Tay, F.P., Liu, D.X.**, 2010. The cellular RNA helicase DDX1 interacts with coronavirus nonstructural protein 14 and enhances viral replication. *J. Virol.* **84**, 8571-8583.
- Yi, M., Schultz, D.E., Lemon, S.M.**, 2000. Functional significance of the interaction of hepatitis A virus RNA with glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): opposing effects of GAPDH and polypyrimidine tract binding protein on internal ribosome entry site function. *J. Virol.* **74**, 6459-6468.
- Youn, S., Leibowitz, J.L., Collisson, E.W.**, 2005. In vitro assembled, recombinant infectious bronchitis viruses demonstrate that the 5a open reading frame is not essential for replication. *Virology* **332**, 206-215.
- Yount, B., Curtis, K.M., Baric, R.S.**, 2000. Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: the transmissible gastroenteritis virus model. *J. Virol.* **74**, 10600-10611.
- Yount, B., Curtis, K.M., Fritz, E.A., Hensley, L.E., Jahrling, P.B., Prentice, E., Denison, M.R., Geisbert, T.W., Baric, R.S.**, 2003. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 12995-13000.
- Yount, B., Denison, M.R., Weiss, S.R., Baric, R.S.**, 2002. Systematic assembly of a full-length infectious cDNA of mouse hepatitis virus strain A59. *J. Virol.* **76**, 11065-11078.
- Yount, B., Roberts, R.S., Lindesmith, L., Baric, R.S.**, 2006. Rewiring the severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) transcription circuit: engineering a recombination-resistant genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 12546-12551.
- Yu, W., Leibowitz, J.L.**, 1995a. A conserved motif at the 3' end of mouse hepatitis virus genomic RNA required for host protein binding and viral RNA replication. *Virology* **214**, 128-138.
- Yu, W., Leibowitz, J.L.**, 1995b. Specific binding of host cellular proteins to multiple sites within the 3' end of mouse hepatitis virus genomic RNA. *J. Virol.* **69**, 2016-2023.
- Zha, J., Han, K.J., Xu, L.G., He, W., Zhou, Q., Chen, D., Zhai, Z., Shu, H.B.**, 2006. The Ret finger protein inhibits signaling mediated by the noncanonical and canonical IkappaB kinase family members. *J. Immunol.* **176**, 1072-1080.
- Zhai, Y., Sun, F., Li, X., Pang, H., Xu, X., Bartlam, M., Rao, Z.**, 2005. Insights into SARS-CoV transcription and replication from the structure of the nsp7-nsp8 hexadecamer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 980-986.
- Zhang, B., Dong, H., Stein, D.A., Iversen, P.L., Shi, P.Y.**, 2008. West Nile virus genome cyclization and RNA replication require two pairs of long-distance RNA interactions. *Virology* **373**, 1-13.



- Zhang, L., Zhang, F., Yu, W., He, T., Yu, J., Yi, C.E., Ba, L., Li, W., Farzan, M., Chen, Z., Yuen, K.Y., Ho, D.**, 2006. Antibody responses against SARS coronavirus are correlated with disease outcome of infected individuals. *J. Med. Virol.* **78**, 1-8.
- Zhang, X., Li, H.P., Xue, W., Lai, M.C.C.**, 1999. Formation of a ribonucleoprotein complex of mouse hepatitis virus involving heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and transcription-regulatory elements of viral RNA. *Virology* **264**, 115-124.
- Zhou, H., Xu, M., Huang, Q., Gates, A.T., Zhang, X.D., Castle, J.C., Stec, E., Ferrer, M., Strulovici, B., Hazuda, D.J., Espeseth, A.S.**, 2008. Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. *Cell Host Microbe* **4**, 495-504.
- Ziebuhr, J.**, 2004. Molecular biology of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**, 412-419.
- Ziebuhr, J.**, 2005. The coronavirus replicase, in: Enjuanes, L. (Ed.), Coronavirus replication and reverse genetics. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, pp. 57-94.
- Ziebuhr, J., Snijder, E.J., Gorbalenya, A.E.**, 2000. Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the *Nidovirales*. *J. Gen. Virol.* **81**, 853-879.
- Zirkel, F., Kurth, A., Quan, P.L., Briese, T., Ellerbrok, H., Pauli, G., Leendertz, F.H., Lipkin, W.I., Ziebuhr, J., Drosten, C., Junglen, S.**, 2011. An insect nidovirus emerging from a primary tropical rainforest. *MBio* **2**, e00077-00011.
- Zuñiga, S., Cruz, J.L., Sola, I., Mateos-Gomez, P.A., Palacio, L., Enjuanes, L.**, 2010. Coronavirus nucleocapsid protein facilitates template switching and is required for efficient transcription. *J. Virol.* **84**, 2169-2175.
- Zuñiga, S., Sola, I., Alonso, S., Enjuanes, L.**, 2004. Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis. *J. Virol.* **78**, 980-994.
- Zuñiga, S., Sola, I., Moreno, J.L., Sabella, P., Plana-Duran, J., Enjuanes, L.**, 2007. Coronavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone. *Virology* **357**, 215-227.
- Zuo, Y., Deutscher, M.P.**, 2001. Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1017-1026.
- Zust, R., Cervantes-Barragan, L., Habjan, M., Maier, R., Neuman, B.W., Ziebuhr, J., Szretter, K.J., Baker, S.C., Barchet, W., Diamond, M.S., Siddell, S.G., Ludewig, B., Thiel, V.**, 2011. Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nat. Immunol.* **12**, 137-143.
- Zust, R., Cervantes-Barragan, L., Kuri, T., Blakqori, G., Weber, F., Ludewig, B., Thiel, V.**, 2007. Coronavirus non-structural protein 1 is a major pathogenicity factor: implications for the rational design of coronavirus vaccines. *PLoS Pathog.* **3**, e109.

## **X. ANEXO**

# Construction of a Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infectious cDNA Clone and a Replicon To Study Coronavirus RNA Synthesis<sup>∇</sup>

Fernando Almazán, Marta L. DeDiego, Carmen Galán, David Escors, Enrique Álvarez, Javier Ortego, Isabel Sola, Sonia Zuñiga, Sara Alonso, Jose L. Moreno, Aitor Nogales, Carmen Capiscot, and Luis Enjuanes\*

*Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Department of Molecular and Cell Biology, Darwin 3, Campus Universidad Autónoma, Cantoblanco, Madrid, Spain*

Received 23 February 2006/Accepted 15 August 2006

**The engineering of a full-length infectious cDNA clone and a functional replicon of the severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) Urbani strain as bacterial artificial chromosomes (BACs) is described in this study. In this system, the viral RNA was expressed in the cell nucleus under the control of the cytomegalovirus promoter and further amplified in the cytoplasm by the viral replicase. Both the infectious clone and the replicon were fully stable in *Escherichia coli*. Using the SARS-CoV replicon, we have shown that the recently described RNA-processing enzymes exoribonuclease, endoribonuclease, and 2'-O-ribose methyltransferase were essential for efficient coronavirus RNA synthesis. The SARS reverse genetic system developed as a BAC constitutes a useful tool for the study of fundamental viral processes and also for developing genetically defined vaccines.**

The etiologic agent causing severe acute respiratory syndrome (SARS) is a novel coronavirus (CoV) (8, 10, 16–18, 21). This virus causes a life-threatening respiratory disease for which no fully efficacious therapy is available. SARS-CoV is a member of group 2 of the *Coronaviridae* family within the order *Nidovirales* (13), which is composed of enveloped, single-stranded, positive-sense RNA viruses relevant in animal and human health (5, 9). Two-thirds of the 29.7-kb SARS-CoV genome carries the replicase gene, which comprises two overlapping open reading frames, ORF 1a and ORF 1b, the latter being translated by a ribosomal frameshift mechanism (29). Translation of both ORFs results in the synthesis of two polypeptides that are processed by viral proteinases to release the components of the replication-transcription complex (36, 37). Besides containing RNA-dependent RNA polymerase, RNA helicase, and proteases (4, 12, 15, 23, 37), which are all common to positive-strand RNA viruses, the CoV replicase was recently predicted to contain a variety of RNA-processing enzymes that are extremely rare or absent in other RNA viruses, including endoribonuclease (NendoU), 3'-to-5' exoribonuclease (ExoN), 2'-O-ribose methyltransferase (2'-O-MT), ADP ribose 1''-phosphatase, and, in a subset of group 2 coronaviruses, cyclic phosphodiesterase (25, 36). These enzymatic activities might be involved in the replication of the largest known RNA virus genome and in the production of an extensive set of 5'- and 3'-coterminal subgenomic RNAs (11, 14, 25, 36).

The study of CoV molecular biology has been profoundly

advanced by the recent construction of full-length cDNA clones (3, 6, 26, 27, 32–34) and self-replicating RNAs, or replicons (2, 28, 30). Due to the large size of the CoV RNA genome and the instability of some CoV replicase gene sequences in bacteria, cDNA clones and replicons have been engineered using bacterial artificial chromosomes (BACs) (3), in vitro ligation of CoV cDNA fragments (32), and vaccinia virus as a vector for the propagation of CoV full-length cDNAs (27). Recently, a SARS-CoV full-length cDNA clone has been generated by the approach of using the in vitro ligation of cDNA fragments (33). This system has been shown to be efficient for the recovery of infectious virus and has been used for the generation of a large collection of deletion mutants of SARS-CoV accessory genes located in the 3' end of the genome (35). However, the construction of a SARS-CoV replicon as a biosafe tool to study fundamental viral processes and to test antiviral drugs has not yet been reported.

This paper describes the construction of a full-length infectious cDNA clone and the first functional replicon of the SARS-CoV Urbani strain (GenBank accession number AY278741) as BACs. In addition, using the SARS-CoV replicon, we have shown that the RNA-processing enzymes ExoN, NendoU, and 2'-O-MT were essential for efficient CoV RNA synthesis.

**Construction and functional analysis of a SARS-CoV infectious cDNA clone as a BAC.** In this article, we use the BAC approach to assemble the SARS-CoV full-length cDNA under the control of the cytomegalovirus (CMV) immediate-early promoter to allow the expression of the viral RNA in the nucleus by cellular RNA polymerase II. This approach was used in our laboratory for the construction of the first CoV infectious cDNA clone (3) and, more recently, for the successful construction of other coronavirus (26) and arterivirus (7) cDNA clones. This system permits the stable maintenance in

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Molecular and Cell Biology, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Darwin 3, Campus Universidad Autónoma, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. Phone: 34 91 585 4555. Fax: 34 91 585 4915. E-mail: L.Enjuanes@cnb.uam.es.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 23 August 2006.

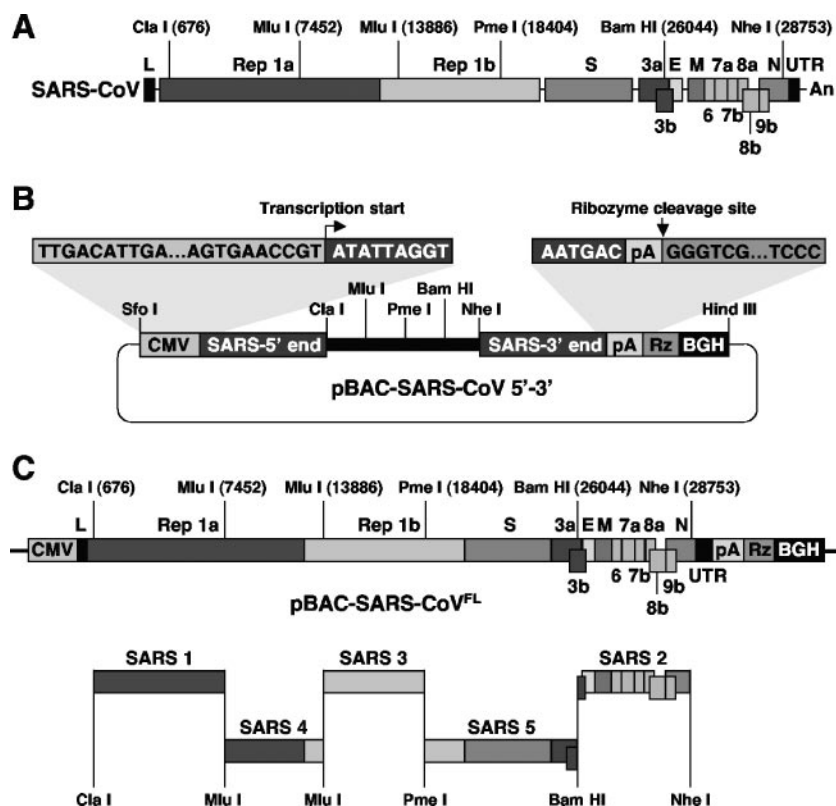


FIG. 1. Strategy to assemble a SARS-CoV infectious cDNA clone as a BAC. (A) Genetic structure of the SARS-CoV Urbani strain genome. Relevant restriction sites used for the assembly of the full-length cDNA clone are indicated. Numbers in parentheses indicate the genomic positions of the first nucleotide of the restriction endonuclease recognition sequence. Letters and numbers indicate the viral genes. L, leader sequence; UTR, untranslated region; An, poly(A) tail. (B) Construction of pBAC-SARS-CoV 5'-3'. After the selection of appropriate restriction sites, the intermediate plasmid pBAC-SARS-CoV 5'-3' was constructed as the backbone for assembling the infectious cDNA clone. This plasmid includes the first 681 nt of the genome under the control of the CMV promoter, a multiple-cloning site containing the restriction sites selected for the final assembly of the infectious clone, and the last 975 nt of the genome, followed by a synthetic poly(A) tail (pA), the hepatitis delta virus ribozyme (Rz), and the bovine growth hormone termination and polyadenylation sequences (BGH). All these elements were precisely joined by overlapping PCR. The CMV promoter transcription start and the ribozyme cleavage site are shown. (C) Schematic diagram showing the five-step cloning strategy used for the assembly of the SARS-CoV full-length cDNA clone. The five overlapping cDNA fragments, named SARS 1 to SARS 5, were sequentially cloned into the plasmid pBAC-SARS-CoV 5'-3' to generate the plasmid pBAC-SARS-CoV<sup>FL</sup>. Relevant restriction sites are indicated. The labels are as described for panel A.

bacteria of large DNA fragments from a variety of complex genomic sources (1, 24). Furthermore, the manipulation of the cDNA clone is similar to that of a conventional plasmid and directly allows the recovery of infectious virus from the cDNA clone without the need for in vitro ligation and transcription steps.

The BAC clone carrying an infectious genome of the SARS-CoV Urbani strain was generated in three steps. The first was selection of appropriate restriction sites in the viral genome (Fig. 1A). The second was construction of the intermediate plasmid pBAC-SARS-CoV 5'-3' as the backbone for assembling the full-length cDNA clone (Fig. 1B). This plasmid includes the first 681 nucleotides (nt) of the genome under the control of the CMV promoter and the last 975 nt of the genome, followed by a 25-nt synthetic poly(A), the hepatitis delta virus ribozyme, and the bovine growth hormone termination and polyadenylation sequences to produce synthetic RNAs bearing authentic 5' and 3' ends of the viral genome. In addition, a multiple-cloning site containing the restriction sites ClaI, MluI, PmeI, BamHI, and NheI, selected in the first step,

was cloned between the viral sequences to allow the assembly of the full-length clone. After transfection of baby hamster kidney (BHK) cells with the intermediate plasmid, the sequence of the 5' and 3' ends of the synthetic RNA generated was confirmed by 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends analysis (data not shown). Finally, the third step was assembly of the full-length cDNA clone (pBAC-SARS-CoV<sup>FL</sup>) by sequential cloning of five overlapping cDNA fragments into the plasmid pBAC-SARS-CoV 5'-3' (Fig. 1C). These cDNAs were generated by standard reverse transcriptase PCR (RT-PCR) with specific oligonucleotides using total RNA from cells infected with the SARS-CoV Urbani strain, kindly provided by the Centers for Diseases Control and Prevention (Atlanta, Ga.), as the template. The cDNA clone sequence was identical to the reported Urbani sequence (21), with the exception of two silent point mutations at positions 10338 (C to T) and 11163 (T to A) that were introduced as genetic markers to distinguish between the virus recovered from the cDNA and the wild-type virus. The assembled SARS-CoV infectious cDNA clone was fully stable during its propagation in *E. coli*

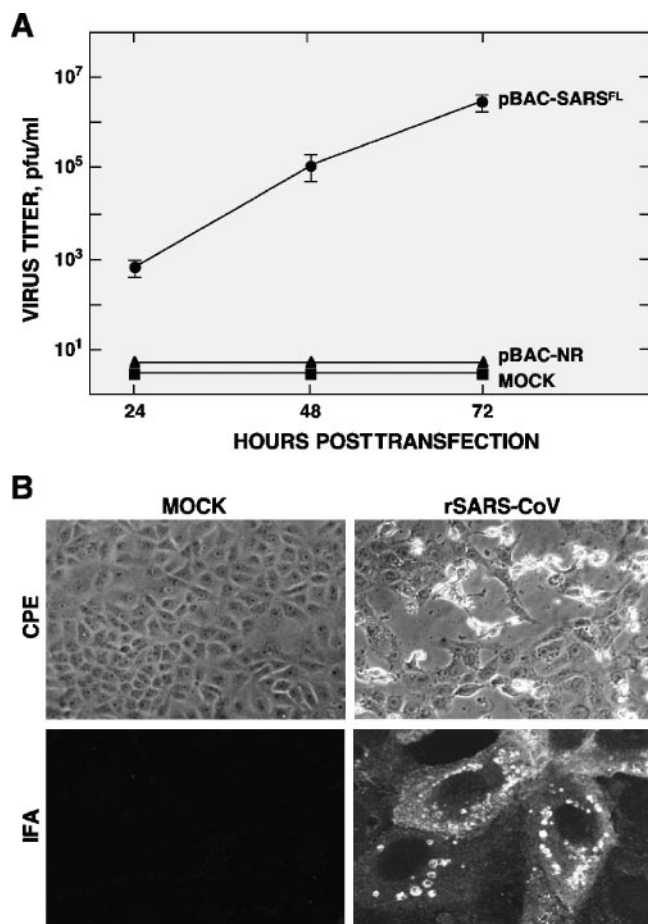


FIG. 2. Recovery of infectious rSARS-CoV from the full-length cDNA clone. (A) Virus rescue. BHK cells were mock transfected or transfected with either the full-length cDNA clone (pBAC-SARS<sup>FL</sup>) or a nonreplicative cDNA clone (pBAC-NR) with a deletion in the replicase gene. Cells were removed with trypsin at 6 hpt and plated over a confluent monolayer of VeroE6 cells, and at the indicated times posttransfection, virus titers were determined by plaque assay on VeroE6 cells. Error bars represent standard deviations of the means from three experiments. (B) VeroE6 cells were mock infected or infected with rSARS-CoV and subsequently analyzed for the induction of cytopathic effect (CPE) by light microscopy. Viral protein expression was analyzed by indirect immunofluorescence (IFA) with a human anti-SARS-CoV polyclonal serum, kindly provided by A. Xu (Sun Yat-sen University, Guangzhou, People's Republic of China), followed by fluorescein isothiocyanate-labeled goat anti-human antibody.

DH10B cells for more than 200 generations, considerably facilitating the genetic manipulation of the viral genome (data not shown). The detailed cloning strategy, plasmid maps, and sequences are available upon request.

To recover infectious virus, BHK cells were grown to 95% confluence in a 25-cm<sup>2</sup> flask and transfected with the cDNA clone by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's specifications. At 6 h posttransfection (hpt), cells were trypsinized, plated over a confluent monolayer of VeroE6 cells grown in a 25-cm<sup>2</sup> flask, and incubated at 37°C for 72 h. Virus titers quickly increased to around  $2 \times 10^6$  PFU/ml at 72 hpt (Fig. 2A). After two passages in VeroE6 cells, the recovered virus was cloned by three rounds of plaque

purification, and the genotypic and phenotypic properties were determined. The rescued virus (rSARS-CoV) induced a clear cytopathic effect in VeroE6 cells, and its identity was confirmed by indirect immunofluorescence using SARS-CoV-specific antibodies (Fig. 2B). Furthermore, it conserved the genetic markers introduced and was identical to the parental virus in terms of plaque morphology, growth kinetics, and mRNA and protein patterns (data not shown).

All work involving infectious SARS-CoV was performed in a biosafety level 3 laboratory at the National Health Institute Carlos III (Madrid, Spain), following the guidelines of the European Commission and the National Institutes of Health. Personnel were double-gloved and wore powered air-purifying respirators (HEPA AirMate; 3M, Saint Paul, MN) to provide a positive-pressure environment within the hoods.

**Generation of a functional SARS-CoV replicon as a BAC.** The availability of a SARS-CoV replicon provides an important tool for the study of fundamental viral processes and for the selection of antiviral drugs against this human pathogen, without the need for growing infectious virus.

To engineer the SARS-CoV-derived replicon, the BAC system was used because it presents several advantages over other approaches, such as easy manipulation, unlimited production of the cDNA, high efficiency of transfection, and intracellular expression of the replicon RNA. The generation of the SARS-CoV replicon was based on the full-length cDNA clone described above and on published data showing that the N protein is required for efficient CoV replication (2, 22). Accordingly, a cDNA containing the untranslated 5' and 3' ends of the Urbani strain genome, the replicase gene, and the N gene preceded by the upstream 143 nt including its natural transcription-regulating sequence was cloned as a BAC under the control of the CMV promoter by following the same approach described for the generation of the full-length cDNA clone (Fig. 3A). In addition, a multiple-cloning site containing the unique restriction sites *PacI*, *AscI*, and *BamHI* was cloned downstream of the replicase gene to allow the cloning and expression of heterologous genes.

To study SARS-CoV replicon activity, the synthesis of N gene mRNA was analyzed in human 293T and BHK cells by RT-PCR (Fig. 3B). Cells were grown to 95% confluence on 35-mm-diameter plates and transfected with 4  $\mu$ g of SARS-CoV replicon by using 12  $\mu$ g of Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's specifications. Total intracellular RNA was extracted at 24 hpt by using the RNeasy mini kit (QIAGEN) and was used as a template for RT-PCR analysis of N gene mRNA synthesis. Amplifications were performed with the reverse primer URB-28630RS (5'-TGCTTC CCTCTGCGTAGAAGCC-3'), complementary to nucleotides 511 to 532 of the N gene, and the forward primer URB-29VS (5'-GCCAACCAACCTCGATCTCTTG-3'), spanning nucleotides 29 to 50 of the Urbani leader sequence. High levels of transcript were detected in both 293T and BHK cells transfected with the replicon (Fig. 3B), indicating that the SARS-CoV replicon was functional, at least at the transcriptional level. To confirm whether the SARS-CoV replicon was also functional at the replication level, the synthesis of genomic positive-strand RNA was analyzed on DNase I-treated samples by real-time RT-PCR using the reverse primer URB-1995RS (5'-ATGGCGTCGACAAGACGTAAT-3'), complementary to nucleotides 1995 to 2015 of the genome, and the forward



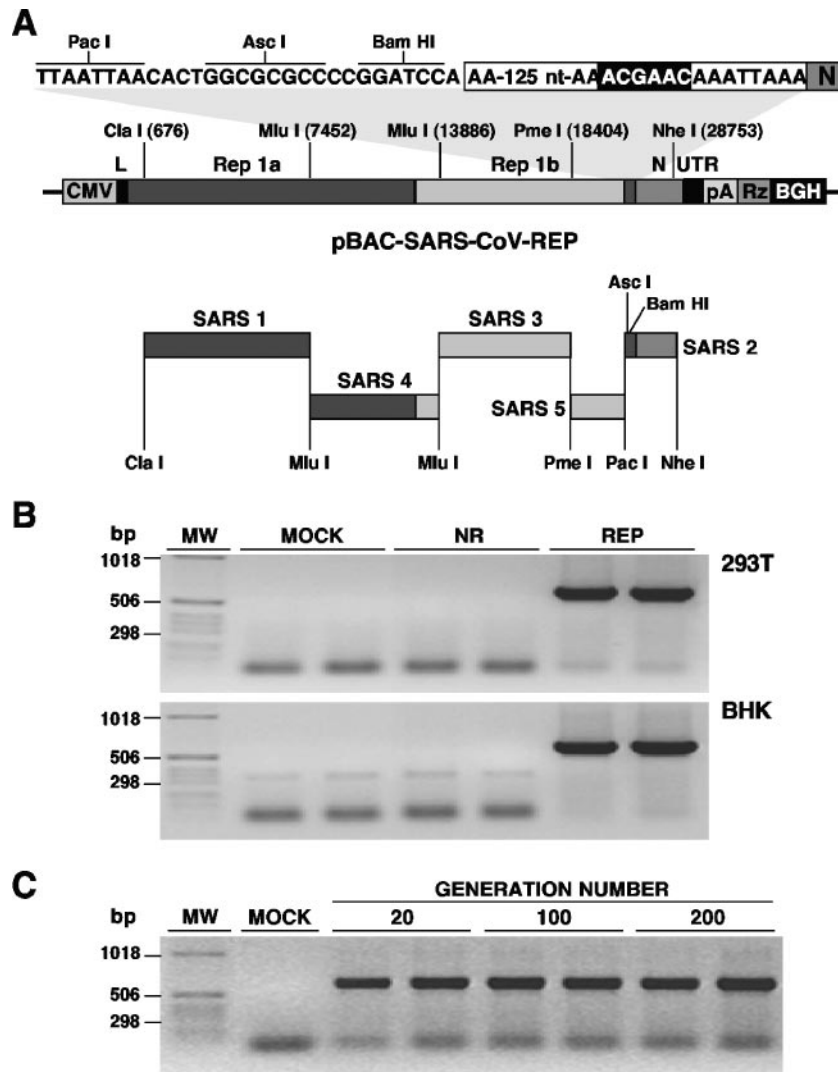


FIG. 3. Assembly and functional analysis of a SARS-CoV-derived replicon. (A) Strategy for the construction of the SARS-CoV replicon. A five-step cloning strategy in which the overlapping cDNA fragments, named SARS 1 to SARS 5, were sequentially cloned into the plasmid pBAC-SARS-CoV 5'-3' to generate plasmid pBAC-SARS-CoV-REP was used. The genetic structure of the replicon and the positions of relevant restriction sites are illustrated. The sequences containing the multiple-cloning site (PacI, AscI, and BamHI) downstream of the replicase gene, and the N gene transcription-regulating sequence (white box) and core sequence (black box) are indicated at the top. Abbreviations are as described in the legend to Fig. 1. (B) Functional analysis of SARS-CoV replicon by RT-PCR. Human 293T and BHK cells were mock transfected or transfected with the replicon (REP) or a nonreplicative construct (NR) by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Total RNA was isolated at 24 hpt and analyzed by RT-PCR with specific oligonucleotides to detect N gene mRNA. Duplicate RT-PCR products amplified in parallel were resolved by electrophoresis in 1% agarose gels. MW, molecular weight markers. (C) Stability of SARS-CoV replicon in *E. coli* cells. Plasmid pBAC-SARS-CoV-REP extracted from *E. coli* DH10B cells that were grown for the indicated number of generations was transfected in 293T cells and the replicon activity analyzed by RT-PCR as described above. Duplicate RT-PCR products amplified in parallel were resolved by electrophoresis in 1% agarose gels. MW, molecular weight markers.

primer URB-1931VS (5'-ACCACTCAATTCCTGATTTGC A-3'), spanning nucleotides 1931 to 1952 of the genome. In our system, the amount of replicon RNA in the cytoplasm of transfected cells is the sum of the RNA transcribed from the CMV promoter in the nucleus plus the amount of RNA self amplified by the viral replicase in the cytoplasm. To determine the amplification exclusively due to the viral replicase, the synthesis of genomic RNA was analyzed in cells transfected with either the wild-type replicon or a nonreplicative construct in which most of the polymerase domain has been deleted. An increase in RNA synthesis of at least 10-fold over the RNA

background level due to the CMV promoter was detected in cells transfected with the wild-type replicon, indicating RNA self-amplification of the SARS-CoV replicon (data not shown).

Similar to the full-length cDNA clone, the replicon was fully stable during its propagation in bacteria for more than 200 generations, as determined by restriction endonuclease analysis. To confirm this result, the replicon activities of cDNAs purified after amplification in bacteria during 20, 100, and 200 generations were analyzed in 293T cells following the procedure described above. No differences in the replicon activities after 200 generations were detected (Fig.

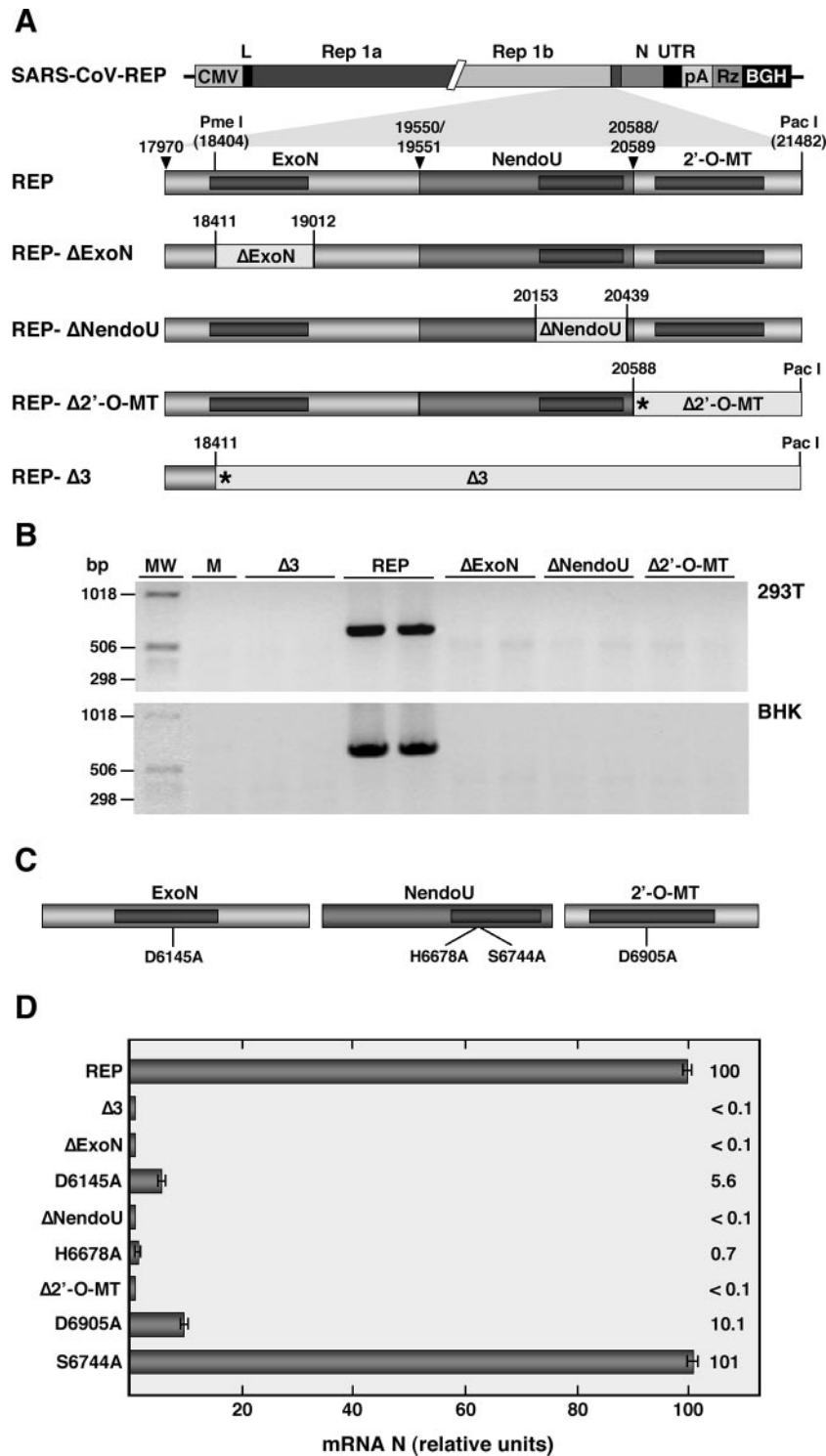


FIG. 4. Construction and functional analysis of a set of SARS-CoV replicons defective in ExoN, NendoU, and 2'-O-MT activities. (A) Schematic diagram showing the genetic structures of the deletion mutant replicons. Relevant restriction sites and the nucleotide positions flanking the deletions from the replicons are indicated. Stop codons are indicated by asterisks. The conserved domains described by Snijder and colleagues (25) are illustrated by the darker bars. Arrowheads indicate the predicted main proteinase (3CL) cleavage sites. Abbreviations above the top bar are as described in the legend to Fig. 1. (B) Functional analysis of mutant replicons by RT-PCR. Human 293T and BHK cells were mock transfected (M) or transfected with the wild-type replicon (REP), the single-deletion mutants ( $\Delta$ ExoN,  $\Delta$ NendoU, and  $\Delta$ 2'-O-MT), or the deletion mutant lacking the three conserved domains ( $\Delta$ 3). Replicon activity was analyzed by RT-PCR with specific oligonucleotides to detect N gene mRNA. Duplicate RT-PCR products amplified in parallel were resolved by electrophoresis in 1% agarose gels. MW, molecular weight markers. (C) Schematic diagram showing the positions of the point mutations introduced into the ExoN (D6145A), NendoU (H6678A or S6744A), and 2'-O-MT (D6905A) domains. Amino acid numbers refer to their positions in the pp1ab polypeptide. (D) Functional analysis of mutant replicons by real-time RT-PCR. The amount of N gene mRNA, expressed as relative units, was determined by real-time RT-PCR in RNA samples isolated at 24 hpt from BHK cells transfected with the wild-type replicon (REP), the deletion mutant lacking the three conserved domains ( $\Delta$ 3), the single-deletion mutants ( $\Delta$ ExoN,  $\Delta$ NendoU, and  $\Delta$ 2'-O-MT), or the point mutants (D6145A, H6678A, S6744A, and D6905A mutants). Mean values from three experiments are represented, with standard deviations shown as error bars.

3C), demonstrating that the generated replicon was fully stable in bacteria.

**Generation of a panel of SARS-CoV replicons defective in ExoN, NendoU, and 2'-O-MT activities.** These RNA-processing enzymes are encoded at the 3' end of ORF 1b, downstream of the helicase domain (25). The identification of a stable processing intermediate comprising these three domains in infectious bronchitis virus-infected cells (31) suggests that their activities might cooperate in the same metabolic pathway.

To study the role of the enzymes ExoN, NendoU, and 2'-O-MT in CoV RNA synthesis, in-frame single-deletion mutants in which the conserved domain of each enzyme (25) was deleted and a mutant replicon lacking the three conserved enzymes were generated by using the SARS-CoV replicon (Fig. 4A). For the generation of these mutants, PmeI-PacI fragments with the desired in-frame-deletions were generated by PCR mutagenesis and cloned into the SARS-CoV replicon, replacing the wild-type PmeI-PacI fragment. The functionality of these constructs was analyzed in comparison with that of the wild-type replicon in 293T and BHK cells by RT-PCR as described above. Interestingly, high levels of N gene mRNA were detected only for cells transfected with the parental replicon (Fig. 4B), suggesting that the RNA-processing enzymes ExoN, NendoU, and 2'-O-MT are essential for SARS-CoV RNA synthesis. Formally, it is not possible to exclude the possibility of a lethal effect of these deletions at the level of RNA structure or pp1ab processing, even though their N- and C-terminal borders were relatively distant from the proteolytic cleavage sites. To overcome this potential limitation, three point mutants, in which putative catalytic and highly conserved residues of ExoN (Asp-6145), NendoU (His-6678), and 2'-O-MT (Asp-6905) (14, 19, 25) were replaced by Ala (D6145A, H6678A, and D6905A, respectively), were generated. In addition, since the Ser-6744 residue has been described to be nonessential for NendoU activity (14), an additional mutant containing an Ala instead of a Ser at this position (S6744A) was generated as a control to confirm that single amino acid substitutions could be tolerated in this domain of the polyprotein (Fig. 4C). The activity of these replicons was compared to that of the deletion mutants and the wild-type replicon. To this end, a quantitative analysis of N gene mRNA expression was performed by real-time RT-PCR using the reverse primer URB-28163RS (5'-TGGGTCCACCAATGTAATGC-3'), complementary to nucleotides 44 to 64 of the N gene, and the forward primer URB-27VS (5'-AAGCCAACCAACCTCGATCTC-3'), spanning nucleotides 27 to 47 of the Urbani leader sequence. As expected, high levels of N gene mRNA were detected in cells transfected with the wild-type replicon or with the control S6744A mutant (Fig. 4D). However, a reduction of more than 90% was observed in the case of both the deletion and point mutants, confirming that the effect on CoV RNA synthesis is most probably due to the abrogation of ExoN, NendoU, and 2'-O-MT activities and not to major changes affecting the RNA structure or polyprotein processing (Fig. 4D). In addition, a 10-fold reduction in the amount of genomic positive-strand RNA was detected for all mutant replicons (data not shown), suggesting that ExoN, NendoU, and 2'-O-MT are essential for efficient CoV replication and transcription. Although it was previously reported that NendoU and ExoN were essential for CoV RNA synthesis (14, 19), this is the first

evidence that 2'-O-MT activity is also essential. Further genetic and biochemical studies will be required to address the specific role of these enzymes in CoV transcription and replication.

Within the *Nidovirales* order, these three RNA-processing enzymes are highly conserved in the families *Coronaviridae* (coronavirus and torovirus) and *Roniviridae*. It has been postulated that these enzymes are involved in RNA processing, possibly in the synthesis of the 5'- and 3'-coterminal subgenomic RNAs (11, 14, 25, 36). Interestingly, only the NendoU domain is conserved in the family *Arteriviridae* (20, 25), suggesting that the RNA synthesis mechanisms of coronavirus and arterivirus might present some differences at the molecular level or that the extra RNA-processing activities (ExoN and 2'-O-MT) present in coronaviruses and roniviruses may be required to synthesize and maintain the large RNA genome (~30 kb) of these virus families. In this context, the ExoN domain, which is predicted to contain a 3'→5' exonuclease activity, may have been acquired to operate in proof-reading mechanisms to improve the fidelity of the RNA-dependent RNA polymerase.

The SARS-CoV replicon assembled as a BAC provides a useful tool for basic studies on CoV transcription and replication, for the safe screening of new antiviral drugs, and for the development of SARS-CoV vaccines.

We thank P. Pérez-Breña from the Human Health Department, Instituto de Salud Carlos III, for facilitating the development of the project and D. Dorado and M. Gonzalez for technical assistance.

This work was supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (BIO2004-00636), the European Community (Frame VI, Projects DISSECT SP22-CT-2004-511060 and RIVIGENE SSPE-CT-2005-022639), and Fort Dodge Veterinaria.

#### REFERENCES

- Adler, H., M. Messerle, and U. H. Koszinowski. 2003. Cloning of herpesviral genomes as bacterial artificial chromosomes. *Rev. Med. Virol.* **13**:111–121.
- Almazán, F., C. Galán, and L. Enjuanes. 2004. The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J. Virol.* **78**:12683–12688.
- Almazán, F., J. M. González, Z. Pénzes, A. Izeta, E. Calvo, J. Plana-Durán, and L. Enjuanes. 2000. Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:5516–5521.
- Anand, K., J. Ziebuhr, P. Wadhwani, J. R. Mesters, and R. Hilgenfeld. 2003. Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs. *Science* **300**:1763–1767.
- Brian, A., and R. S. Baric. 2005. Coronavirus genome structure and replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **287**:1–30.
- Casais, R., V. Thiel, S. G. Siddell, D. Cavanagh, and P. Britton. 2001. Reverse genetics system for the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *J. Virol.* **75**:12359–12369.
- Choi, Y. J., S. I. Yun, S. Y. Kang, and Y. M. Lee. 2006. Identification of 5' and 3' cis-acting elements of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus: acquisition of novel 5' AU-rich sequences restored replication of a 5'-proximal 7-nucleotide deletion mutant. *J. Virol.* **80**:723–736.
- Drosten, C., S. Gunther, W. Preiser, S. van der Werf, H. R. Brodt, S. Becker, H. Rabenau, M. Panning, L. Kolesnikova, R. A. Fouchier, A. Berger, A. M. Burguiere, J. Cinatti, M. Eickmann, N. Escriou, K. Grywna, S. Kramme, J. C. Manuguerra, S. Muller, V. Rickerts, M. Sturmer, S. Vieth, H. D. Klenk, A. D. Osterhaus, H. Schmitz, and H. W. Doerr. 2003. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* **348**:1967–1976.
- Enjuanes, L., W. Spaan, E. Snijder, and D. Cavanagh. 2000. Nidovirales, p. 827–834. *In* M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carsten, M. K. Estes, S. M. Lemon, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner (ed.), *Virus taxonomy*. Academic Press, New York, N.Y.
- Fouchier, R. A., T. Kuiken, M. Schutten, G. van Amerongen, G. J. van Doornum, B. G. van den Hoogen, M. Peiris, W. Lim, K. Stohr, and A. D. Osterhaus. 2003. Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* **423**:240.



11. Gorbalenya, A. E., L. Enjuanes, and E. J. Snijder. 2006. *Nidovirales*: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res.* **117**:17–37.
12. Gorbalenya, A. E., E. V. Koonin, A. P. Donchenko, and V. M. Blinov. 1989. Coronavirus genome: prediction of putative functional domains in the non-structural polyprotein by comparative amino acid sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* **17**:4847–4861.
13. Gorbalenya, A. E., E. J. Snijder, and W. J. Spaan. 2004. Severe acute respiratory syndrome coronavirus phylogeny: toward consensus. *J. Virol.* **78**:7863–7866.
14. Ivanov, K. A., T. Hertzog, M. Rozanov, S. Bayer, V. Thiel, A. E. Gorbalenya, and J. Ziebuhr. 2004. Major genetic marker of nidoviruses encodes a replicative endoribonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:12694–12699.
15. Ivanov, K. A., V. Thiel, J. C. Dobbe, Y. van der Meer, E. J. Snijder, and J. Ziebuhr. 2004. Multiple enzymatic activities associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus helicase. *J. Virol.* **78**:5619–5632.
16. Ksiazek, T. G., D. Erdman, C. S. Goldsmith, S. R. Zaki, T. Peret, S. Emery, S. Tong, C. Urbani, J. A. Comer, W. Lim, P. E. Rollin, S. F. Dowell, A. E. Ling, C. D. Humphrey, W. J. Shieh, J. Guarner, C. D. Paddock, P. Rota, B. Fields, J. DeRisi, J. Y. Yang, N. Cox, J. M. Hughes, J. W. LeDuc, W. J. Bellini, and L. J. Anderson. 2003. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* **348**:1953–1966.
17. Kuiken, T., R. A. Fouchier, M. Schutten, G. F. Rimmelzwaan, G. van Amerongen, D. van Riel, J. D. Laman, T. de Jong, G. van Doornum, W. Lim, A. E. Ling, P. K. Chan, J. S. Tam, M. C. Zambon, R. Gopal, C. Drosten, S. van der Werf, N. Escriou, J. C. Manuguerra, K. Stohr, J. S. Peiris, and A. D. Osterhaus. 2003. Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* **362**:263–270.
18. Marra, M. A., S. J. Jones, C. R. Astell, R. A. Holt, A. Brooks-Wilson, Y. S. Butterfield, J. Khattri, J. K. Asano, S. A. Barber, S. Y. Chan, A. Cloutier, S. M. Coughlin, D. Freeman, N. Girn, O. L. Griffith, S. R. Leach, M. Mayo, H. McDonald, S. B. Montgomery, P. K. Pandoh, A. S. Petrescu, A. G. Robertson, J. E. Schein, A. Siddiqui, D. E. Smailus, J. M. Stott, G. S. Yang, F. Plummer, A. Andonov, H. Artsob, N. Bastien, K. Bernard, T. F. Booth, D. Bowness, M. Czuba, M. Drebot, L. Fernando, R. Flick, M. Garbutt, M. Gray, A. Grolla, S. Jones, H. Feldmann, A. Meyers, A. Kabani, Y. Li, S. Normand, U. Stroher, G. A. Tipples, S. Tyler, R. Vogrig, D. Ward, B. Watson, R. C. Brunham, M. Krajden, M. Petric, D. M. Skowronski, C. Upton, and R. L. Roper. 2003. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* **300**:1399–1404.
19. Minskaia, E., T. Hertzog, A. E. Gorbalenya, V. Campanacci, C. Cambillau, B. Canard, and J. Ziebuhr. 2006. Discovery of an RNA virus 3'→5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:5108–5113.
20. Posthuma, C. C., D. D. Nedialkova, J. C. Zevenhoven-Dobbe, J. H. Blokhuys, A. E. Gorbalenya, and E. J. Snijder. 2006. Site-directed mutagenesis of the Nidovirus replicative endoribonuclease NendoU exerts pleiotropic effects on the arterivirus life cycle. *J. Virol.* **80**:1653–1661.
21. Rota, P. A., M. S. Oberste, S. S. Monroe, W. A. Nix, R. Campagnoli, J. P. Icenogle, S. Penaranda, B. Bankamp, K. Maher, M. H. Chen, S. Tong, A. Tamin, L. Lowe, M. Frace, J. L. DeRisi, Q. Chen, D. Wang, D. D. Erdman, T. C. Peret, C. Burns, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, A. Sanchez, S. Liffick, B. Holloway, J. Limor, K. McCaustland, M. Olsen-Rasmussen, R. Fouchier, S. Gunther, A. D. Osterhaus, C. Drosten, M. A. Pallansch, L. J. Anderson, and W. J. Bellini. 2003. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* **300**:1394–1399.
22. Schelle, B., N. Karl, B. Ludewig, S. G. Siddell, and V. Thiel. 2005. Selective replication of coronavirus genomes that express nucleocapsid protein. *J. Virol.* **79**:6620–6630.
23. Seybert, A., A. Hegyi, S. G. Siddell, and J. Ziebuhr. 2000. The human coronavirus 229E superfamily 1 helicase has RNA and DNA duplex-unwinding activities with 5'-to-3' polarity. *RNA* **6**:1056–1068.
24. Shizuya, H., B. Birren, U. J. Kim, V. Mancino, T. Slepak, Y. Tachiiri, and M. Simon. 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:8794–8797.
25. Snijder, E. J., P. J. Bredenbeek, J. C. Dobbe, V. Thiel, J. Ziebuhr, L. L. Poon, Y. Guan, M. Rozanov, W. J. Spaan, and A. E. Gorbalenya. 2003. Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J. Mol. Biol.* **331**:991–1004.
26. St.-Jean, J. R., M. Desforges, F. Almazán, H. Jacomy, L. Enjuanes, and P. J. Talbot. 2006. Recovery of a neurovirulent human coronavirus OC43 from an infectious cDNA clone. *J. Virol.* **80**:3670–3674.
27. Thiel, V., J. Herold, B. Schelle, and S. G. Siddell. 2001. Infectious RNA transcribed in vitro from a cDNA copy of the human coronavirus genome cloned in vaccinia virus. *J. Gen. Virol.* **82**:1273–1281.
28. Thiel, V., J. Herold, B. Schelle, and S. G. Siddell. 2001. Viral replicase gene products suffice for coronavirus discontinuous transcription. *J. Virol.* **75**:6676–6681.
29. Thiel, V., K. A. Ivanov, A. Putics, T. Hertzog, B. Schelle, S. Bayer, B. Weissbrich, E. J. Snijder, H. Rabenau, H. W. Doerr, A. E. Gorbalenya, and J. Ziebuhr. 2003. Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J. Gen. Virol.* **84**:2305–2315.
30. Thiel, V., N. Karl, B. Schelle, P. Disterer, I. Klagge, and S. G. Siddell. 2003. Multigene RNA vector based on coronavirus transcription. *J. Virol.* **77**:9790–9798.
31. Xu, H. Y., K. P. Lim, S. Shen, and D. X. Liu. 2001. Further identification and characterization of novel intermediate and mature cleavage products released from the ORF 1b region of the avian coronavirus infectious bronchitis virus 1a/1b polypeptide. *Virology* **288**:212–222.
32. Yount, B., K. M. Curtis, and R. S. Baric. 2000. Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: transmissible gastroenteritis virus model. *J. Virol.* **74**:10600–10611.
33. Yount, B., K. M. Curtis, E. A. Fritz, L. E. Hensley, P. B. Jahrling, E. Prentice, M. R. Denison, T. W. Geisbert, and R. S. Baric. 2003. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:12995–13000.
34. Yount, B., M. R. Denison, S. R. Weiss, and R. S. Baric. 2002. Systematic assembly of a full-length infectious cDNA of mouse hepatitis virus strain A59. *J. Virol.* **76**:11065–11078.
35. Yount, B., R. S. Roberts, A. C. Sims, D. Deming, M. B. Frieman, J. Sparks, M. R. Denison, N. Davis, and R. S. Baric. 2005. Severe acute respiratory syndrome coronavirus group-specific open reading frames encode nonessential functions for replication in cell cultures and mice. *J. Virol.* **79**:14909–14922.
36. Ziebuhr, J. 2005. The coronavirus replicase. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **287**:57–94.
37. Ziebuhr, J., E. J. Snijder, and A. E. Gorbalenya. 2000. Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the *Nidovirales*. *J. Gen. Virol.* **81**:853–879.



# Host cell proteins interacting with the 3' end of TGEV coronavirus genome influence virus replication

Carmen Galán<sup>a</sup>, Isabel Sola<sup>a</sup>, Aitor Nogales<sup>a</sup>, Benjamin Thomas<sup>b</sup>, Alexandre Akoulitchev<sup>b,1</sup>, Luis Enjuanes<sup>a,\*</sup>, Fernando Almazán<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Molecular and Cell Biology, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, C/Darwin 3, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Oxford Central Proteomics Facility, Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, UK

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 27 April 2009

Returned to author for revision 25 May 2009

Accepted 3 June 2009

Available online 5 July 2009

### Keywords:

Coronavirus

Proteomics

RNA-binding proteins

siRNAs

RNA synthesis

## ABSTRACT

Coronavirus RNA synthesis is performed by a multienzymatic replicase complex together with cellular factors. This process requires the specific recognition of RNA *cis*-acting signals located at the ends of the viral genome. To identify cellular proteins involved in coronavirus RNA synthesis, transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) genome ends, harboring essential *cis*-acting signals for replication, were used as baits for RNA affinity protein purification. Ten proteins were preferentially pulled down with either the 5' or 3' ends of the genome and identified by proteomic analysis. Nine of them, including members of the heterogeneous ribonucleoprotein family of proteins (hnRNPs), the poly(A)-binding protein (PABP), the p100 transcriptional co-activator protein and two aminoacyl-tRNA synthetases, showed a preferential binding to the 3' end of the genome, whereas only the polypyrimidine tract-binding protein (PTB) was preferentially pulled down with the 5' end of the genome. The potential function of the 3' end-interacting proteins in virus replication was studied by analyzing the effect of their silencing using a TGEV-derived replicon and the infectious virus. Gene silencing of PABP, hnRNP Q, and glutamyl-prolyl-tRNA synthetase (EPRS) caused a significant 2 to 3-fold reduction of viral RNA synthesis. Interestingly, the silencing of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), initially used as a control gene, caused a 2 to 3-fold increase in viral RNA synthesis in both systems. These data suggest that PABP, hnRNP Q, and EPRS play a positive role in virus infection that could be mediated through their interaction with the viral 3' end, and that GAPDH has a negative effect on viral infection.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Introduction

Transmissible gastroenteritis virus (TGEV) is a member of the *Coronaviridae* family, included in the *Nidovirales* order (Enjuanes et al., 2000, 2008). Coronaviruses (CoVs) have been classified in three different groups based on antigenic and genetic criteria. The most extensively studied group members are the TGEV and the human coronavirus (HCoV) 229E from group 1, the mouse hepatitis virus (MHV) and the severe acute respiratory syndrome (SARS) virus (SARS-CoV) from group 2, and the infectious bronchitis virus (IBV) from group 3. CoV infections cause a variety of diseases relevant in animal and human health, being of special relevance the SARS in humans (Drosten et al., 2003; Perlman et al., 2000). After the SARS outbreak in 2002 the interest to understand the molecular basis of CoV replication increased and, as a result, in the last years more than

30 new CoVs have been identified with a broad host distribution (Vijaykrishna et al., 2007).

CoVs contain the largest known single-stranded positive-sense infectious RNA genomes, varying between 27 and 31 kb in length (Enjuanes et al., 2008; Masters, 2006). The CoV genome resembles the structure of most cellular mRNAs, containing a cap structure at the 5' end, a poly(A) tail at the 3' end, and 5' and 3' untranslated regions (UTRs). The replicase gene, that occupies the 5' two thirds of the genome, includes two overlapping open reading frames (ORF 1a and ORF 1b) that are translated into two large co-amino-terminal polyproteins, pp1a and pp1ab, the second one expressed by a ribosomal frameshift mechanism (Brierley et al., 1989). Both polyproteins are autoproteolytically cleaved into up to 16 mature products (nsp1 to nsp16), which are believed to be part of the replication-transcription complex (Ziebuhr et al., 2000). CoV replicase gene is extremely complex and, besides the RNA-dependent RNA-polymerase and helicase activities, it encodes other enzymes less frequent or exclusive among RNA viruses (Masters, 2006; Snijder et al., 2003; Ziebuhr, 2005), such as an endoribonuclease, a 3'–5' exoribonuclease, a 2'-O-ribose methyltransferase, a ribose ADP 1" phosphatase, and a second RNA-dependent RNA-polymerase (Imbert et al., 2006). In addition to the

\* Corresponding author. Fax: +34 91 585 4915.

E-mail address: [L.Enjuanes@cnb.csic.es](mailto:L.Enjuanes@cnb.csic.es) (L. Enjuanes).

<sup>1</sup> Present address: Oxford BioDynamics Limited, Oxford University Begbroke Science Park, Sandy Lane, Yarnton OX5 1PF, UK.

replicase components, the viral nucleoprotein has been shown to play a major role in CoV RNA synthesis (Almazán et al., 2004; Schelle et al., 2005). The resulting virus-encoded replication–transcription complex presumably associates with host-cell proteins to complete the synthesis of viral RNA (Enjuanes et al., 2006; Masters, 2006).

To date, several cellular proteins have been identified on the basis of their ability to interact *in vitro* with *cis*-acting replication signals of CoVs from group 2 (MHV and bovine CoV), including the polypyrimidine tract-binding protein (PTB) (Li et al., 1999), heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) A1 and Q (Choi et al., 2004; Li et al., 1997), mitochondrial aconitase (Nanda and Leibowitz, 2001), and poly(A)-binding protein (PABP) (Spagnolo and Hogue, 2000). Of these proteins, a functional effect on CoV RNA synthesis has been described for the hnRNP A1 (Shen and Masters, 2001; Shi et al., 2000), hnRNP Q (Choi et al., 2004) and PTB (Choi et al., 2002; Li et al., 1999). However, no interaction or functional study with cellular proteins has been reported for group 1 CoVs.

In this study, we identified a set of 10 host proteins preferentially interacting with either the 5' or 3' ends of the TGEV genome by RNA affinity chromatography and mass spectrometry analysis. Among these, the PTB was found to preferentially interact with the 5' end of the TGEV genome while a subset of 9 proteins, including several hnRNPs (A1, A0, A2B1, Q, and U), the glutamyl-prolyl-tRNA synthetase (EPRS), the arginyl-tRNA synthetase, the PABP, and the p100 transcriptional co-activator, showed a preferential binding to the 3' end. The relevance of the 3' end-interacting proteins on TGEV infection was analyzed using RNA silencing approaches. A significant and highly reproducible reduction of 2 to 3-fold in RNA synthesis and virus titer was evidenced after silencing the expression of PABP, hnRNP Q and EPRS proteins, suggesting that these factors play a positive role in TGEV infection. Interestingly, silencing of the control gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) caused a 2 to 3-fold increase in TGEV RNA synthesis and virus titer, suggesting that this protein might have a role counteracting TGEV infection.

## Results

### Host proteins interacting with the 5' and 3' ends of TGEV genome

To identify host-cell proteins potentially involved in TGEV RNA synthesis, a screening based on the binding to 5' and 3' TGEV RNA genome ends was used. To this end, two synthetic RNAs containing the first 504 nt of the 5' end of the TGEV genome and the last 493 nt of the 3' end plus a poly(A) tail were biotin labeled during the *in vitro* transcription and used as baits for an RNA affinity protein isolation (Fig. 1). The length of the transcripts was chosen based on the sequences required for the amplification of TGEV-derived defective RNAs (Escors et al., 2003; Izeta et al., 1999; and unpublished results) and the biotin labeling was random and spaced out in order to minimize interference of the biotin groups with potential RNA structures.

The biotin labeled RNA baits were immobilized on a Streptavidin Sepharose resin and incubated with cell extracts from infected porcine ST and rodent BHK-pAPN (expressing TGEV receptor) cells that are highly susceptible to TGEV infection. In order to facilitate protein identification in the databases, extracts from the human hepatoma-derived cell line Huh-7, which is susceptible to the TGEV PUR46-C11 strain infection, were also used. RNA–protein complexes were isolated by centrifugation, resolved by electrophoresis in denaturing precasted gels and identified by mass spectrometry (Fig. 2A). From the pulled down proteins, a low proportion showed a preferential binding for one of the genome ends, that was reproduced for most of them in the three cell lines (Fig. 2B). Three independent RNA pull down assays were performed and all the proteins showing a preferential binding for one of the TGEV genome ends were excised from the gels and identified by mass spectrometry. A set of 10 proteins was reproducibly identified in at least two out of three experiments with significant MASCOT scores ( $p > 0.05$ ). The percentage of protein identifications varied depending on the species of origin and it was 100% for human, 70% for rodent and 60% for porcine proteins (Table 1). That was probably a consequence of sequence variations with respect to the public database sequences for these species.

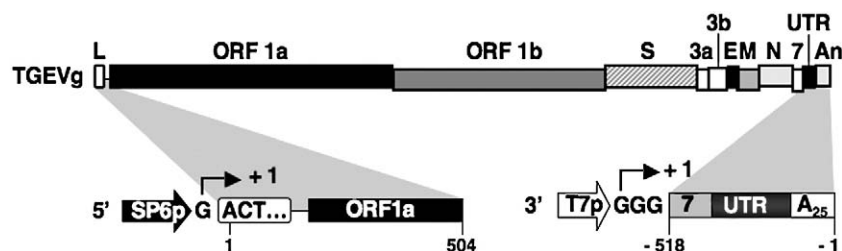
Among the identified proteins, PTB was the only one showing a preferential binding to the 5' end of the genome, whereas nine proteins were found to bind preferentially to the 3' end (Fig. 2B and Table 1). These proteins include several hnRNPs (A1, A0, A2B1, Q, and U) involved in RNA processing and metabolism, the translation factors EPRS, arginyl-tRNA synthetase and PABP, and the p100 transcriptional co-activator.

### Identification by Western-blot of host proteins differentially interacting with TGEV genome ends

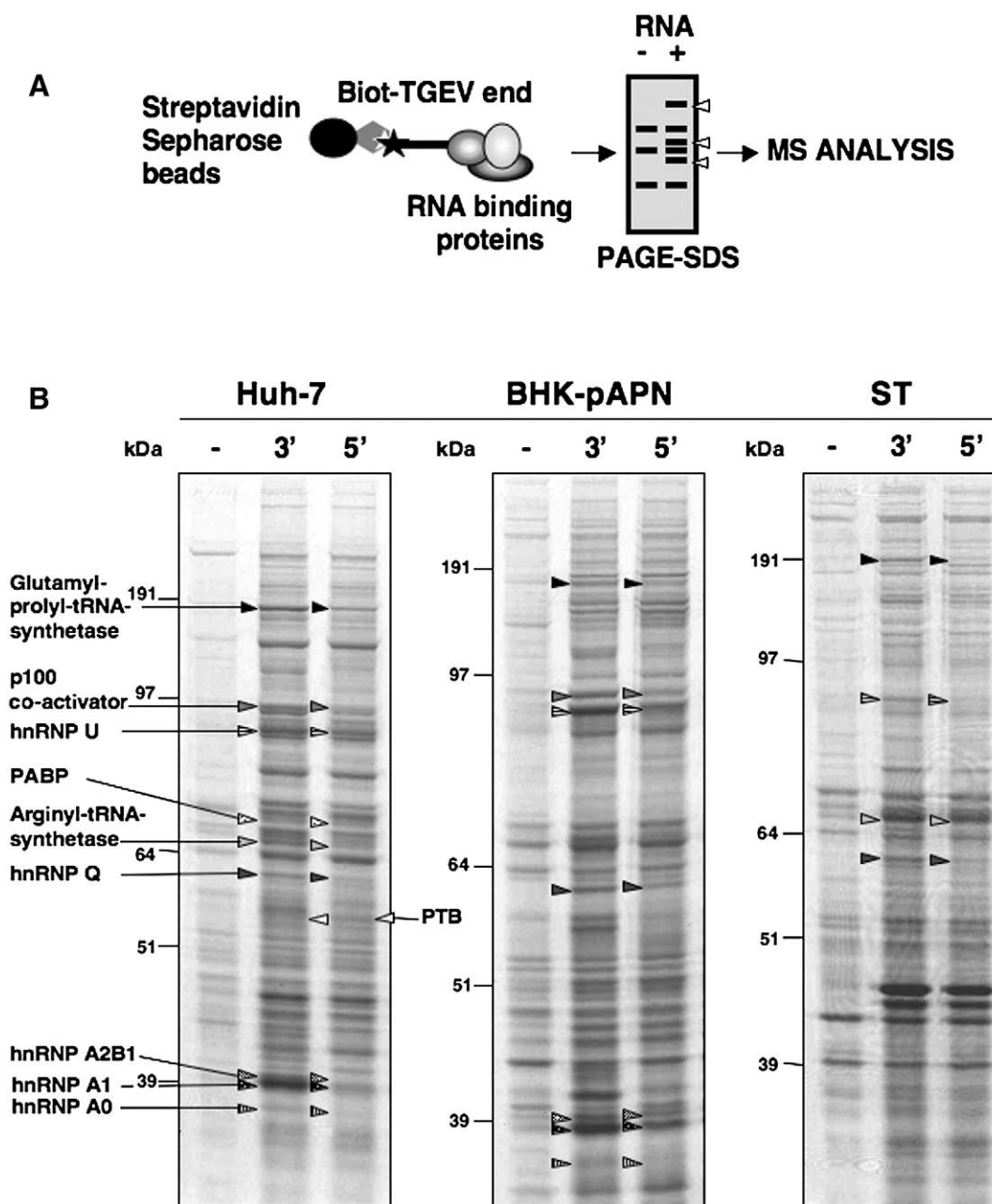
To further confirm the preferential binding to one of the viral genome ends observed in the pull down experiments, a Western-blot analysis of the pulled down proteins from infected Huh-7 cell extracts was performed using specific antibodies. A strong binding preference for the 3' end of the genome was confirmed for the hnRNPs U, A1, A2B1, and A0 proteins (Fig. 3A) while a moderate preference was observed for the EPRS, PABP, p100 and hnRNP Q proteins (Fig. 3B). In addition, a preferential interaction of the PTB with the 5' end was also confirmed (Fig. 3C). In contrast, the viral nucleoprotein that was used as a loading control, was pulled down with a similar efficiency with both genome ends (Fig. 3D). Similar results were obtained with cell extracts from ST or BHK-pAPN infected cells (data not shown).

### Effect of silencing the expression of 3' end-interacting proteins on TGEV replicon activity

One of the initial steps of CoV RNA synthesis involves the specific recognition of the viral 3' end to synthesize the negative-strand RNA.



**Fig. 1.** Genetic structure of the TGEV genome and derived transcription templates. The bar on top represents the TGEV virus genome in which the different genes are illustrated as boxes. The bars below the genome represent the transcription templates for the generation of 5' and 3' RNA ends used in this study. The sequence relationship between the genome and the transcription templates is indicated by shadowed areas. The G nucleotides out of the boxes indicate additional non-viral sequences required for the *in vitro* transcription. The starting sites of transcription are indicated as +1. Numbers below the bars indicate genome positions. TGEVg, TGEV genome; L, leader; ORF 1a and ORF 1b, replicase genes; S, spike gene; 3a and 3b, non-structural genes 3a and 3b; E, envelope protein gene; M, membrane protein gene; N, nucleoprotein gene; 7, non-structural gene 7; UTR, untranslated region; An, poly(A); SP6p and T7p, SP6 and T7 promoters, respectively.



**Fig. 2.** RNA affinity isolation of proteins preferentially interacting with the ends of the TGEV genome. (A) Scheme of the RNA affinity chromatography. (B) Proteins (600 µg) from infected Huh-7, BHK-pAPN, and ST cell extracts were pulled down, separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. All the bands showing a preferential interaction for one of the TGEV genome ends were excised (in both lanes and for the three cell lines) and analyzed by mass spectrometry. Differentially isolated proteins are listed and the band of origin indicated by arrows for the Huh-7 cells. The equivalent differentially isolated proteins are represented with arrowheads of the same pattern for BHK-pAPN and ST cells. The hnRNPs A1 and A2B1, which are not highlighted in the presented gel from infected ST cell extracts, were clearly identified in other experiments (Table 1). Molecular size markers are shown in kilodaltons.

Therefore, proteins showing a preferential binding to the 3' end were selected for further functional analysis. To evaluate the impact of these host proteins on TGEV RNA synthesis, their expression in 293T cells was knocked down with siRNAs and the effect on the TGEV replicon activity was analyzed by evaluating the production of subgenomic RNA 7 by real-time reverse transcription-PCR (Q-RT-PCR), in comparison with mRNA 7 levels in cells transfected with a commercially validated negative control siRNA (Ambion, Table 2).

To perform the silencing assays, human 293T cells were selected because they are efficiently transfected, support the replication of the TGEV replicon (Almazán et al., 2004), and because of the availability of pre-designed siRNA sequences and gene expression assays to monitor the silencing of human genes. Transfection

efficiency of siRNAs and silencing were initially optimized using a Cy3-labeled validated-siRNA against the GAPDH gene, reaching transfection efficiencies close to 100% and a reduction of 80% at the mRNA level (data not shown). Synthetic siRNA duplexes against the GAPDH (silencing positive control) and the candidate genes were transfected twice into 293T cells to allow sustained mRNA silencing for at least 70 h in order to achieve detectable silencing at the protein level (Fig. 4A). Chemically modified siRNAs (Silencer Select siRNA, Ambion) were used in order to reduce the dose of transfected siRNAs and the potential off-target effects (Elmen et al., 2005). In addition, two different siRNAs per target were tested separately. Six hours after the second siRNA transfection, the TGEV replicon was transfected and total RNA and protein were isolated at



**Table 1**

Proteins differentially isolated with the ends of the TGEV genome.

RNA bait	Accession no.	Protein name <sup>a</sup>	Function <sup>b</sup>	Mr	Masses matched/ searched	Score/threshold/ database <sup>c</sup>	Species <sup>d</sup>	N <sup>e</sup>
3'TGEV	gi 4504445	<b>hnRNP A1</b>	RNA transport, processing, and splicing	34289	11/32	<b>107</b> /70/m	H, R, P	3
3'TGEV	gi 4504447	<b>hnRNP A2B1</b>	RNA transport and splicing	36041	16/32	<b>165</b> /65/Hs	H, R, P	3*
3'TGEV	gi 5803036	<b>hnRNP A0</b>	RNA splicing	30993	5/18	<b>76</b> /65/Hs	H, R	3
3'TGEV	gi 3202000	<b>hnRNP U</b>	RNA processing and splicing	91164	19/35	<b>136</b> /78/nr	H, R, P	3*
3'TGEV	gi 44888326	<b>hnRNP Q</b> (SYNCRIP)	RNA processing and splicing	69818	27/66	<b>321</b> /76/nr	H, R, P	3*
3'TGEV	gi 693937	Polyadenylate binding protein ( <b>PABP</b> )	RNA splicing and stabilization	70671	9/13	<b>84</b> /69/m	H	3*
3'TGEV	gi 5803036	Glutamyl-prolyl tRNA synthetase ( <b>EPRS</b> )	Translation	172080	25/28	<b>269</b> /78/nr	H, R, P	3*
3'TGEV	gi 30583627	Arginyl-tRNA synthetase	Translation	76129	17/84	<b>111</b> /76/nr	H, P	2*
3'TGEV	gi 60415925	staphylococcal nuclease domain containing 1; <b>p100</b> co-activator	Transcription and RNA interference	102709	29/40	<b>363</b> /76/nr	H, R	3
5'TGEV	gi 131529	Polypyrimidine tract-binding protein 1 ( <b>PTB</b> )	RNA splicing	56671	1/1	<b>82</b> /50/nr	H	2

<sup>a</sup> When alternative names are given, the one used in this study is shown in boldface.<sup>b</sup> Biological process according to Gene Ontology.<sup>c</sup> Mascot scores are given in boldface. Mascot threshold scores indicate the limit score from which the identification was significant ( $p < 0.05$ ). Searches were performed against the NCBI database without restrictions (nr). In the indicated cases taxonomy was restricted to humans (Hs) or mammals (m).<sup>d</sup> Different species in which the protein was identified in parallel experiments, coming from human Huh-7 (H), rodent BHK-pAPN (R) or porcine ST (P) cell extracts.<sup>e</sup> Number of times that the protein was identified showing a clear binding preference for the indicated RNA bait. Asterisks indicate that the identification was confirmed by MS/MS.

36 and 48 h posttransfection (90 and 102 h after the first siRNA transfection, respectively) to evaluate silencing of the target gene and the replicon activity (Fig. 4A). Efficiencies for the three consecutive transfections, cell viability, and silencing window during 3 days prior to the phenotypic assay were optimized by studying both mRNA and protein levels.

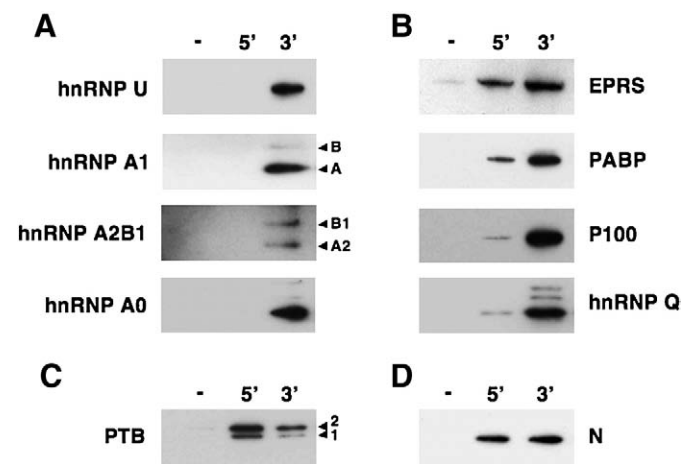
For further studies PABP, hnRNP Q, and EPRS proteins were chosen because they showed good silencing efficiencies at both mRNA and protein levels at times posttransfection in which good cell viability (>95%) was observed (data not shown). The silencing window of PABP, hnRNP Q, and EPRS at the mRNA level reached a maximum at 48 h after the first transfection (data not shown) that was prolonged at least until 102 h posttransfection (Fig. 4B). A reduction of 80% at the RNA level was detected for the positive control gene GAPDH. In the case of the target genes, the reduction in mRNA levels was dependent on siRNA sequence and it was within 70–95% for at least one siRNA of PABP and EPRS genes, and around 60% for both siRNAs of hnRNP Q gene (Fig. 4B). Silencing at the protein level was evaluated at 102 h after the first transfection of the siRNAs. A reduction of about 50% for hnRNP Q and between 65 and 85% for GAPDH, PABP and EPRS was observed (Fig. 4C).

Viral mRNA 7 expression was quantified as a measure of replicon activity at 36 and 48 h after the replicon transfection (90 and 102 h after the first siRNA transfection, respectively). A reproducible and significant reduction in replicon activity of 2 to 3-fold for PABP, hnRNP Q, and EPRS gene silencing was observed in comparison to reference levels from cells transfected with a validated negative control siRNA (Fig. 4D), suggesting that these factors have an important positive effect on replicon RNA synthesis. Reduction of replicon activity was transient, showing a good correlation with the lowest protein levels after silencing and a dose-depending effect in relation to the silencing potency of different siRNA sequences (Fig. 4D). Interestingly, a significant increment of about 3-fold in the replicon activity was observed after GAPDH silencing (Fig. 4D), indicating that GAPDH has a negative effect on replicon RNA synthesis. Although these effects were moderate, they were highly reproducible and statistically significant, and of similar magnitude than those reported in other viral systems (Hara et al., 2009; Pettit Kneller et al., 2009).

#### Effect of GAPDH, PABP, hnRNP Q and EPRS gene silencing on TGEV replication

To analyze the impact of silencing the expression of selected genes on TGEV RNA synthesis and infectious virus production, the human

cell line Huh-7, which is susceptible to TGEV PUR46-C11 strain infection, was used. As described for the replicon system, the transfection efficiency of siRNAs and silencing were optimized in Huh-7 cells using a Cy3-labeled validated siRNA against the GAPDH gene (data not shown). In addition, only the siRNAs providing higher silencing efficiencies for each target gene were chosen to perform the phenotypic assays (Table 2 and Fig. 4). Synthetic siRNAs were transfected into Huh-7 cells by reverse transfection and at 48 h posttransfection the cells were infected with the TGEV PUR46-C11 strain at a multiplicity of infection (MOI) of 5. A single siRNA transfection step was sufficient to achieve sustained mRNA and detectable protein silencing at the times of the phenotypic analysis. Total RNA was isolated at 36 and 72 h postinfection (84 and 120 h after transfection of the siRNAs, respectively) to evaluate silencing at the mRNA level and viral RNA synthesis by Q-RT-PCR with specific Taqman gene expression assays (Fig. 5A). Silencing efficiency at mRNA level was within the 85–95% range for GAPDH, PABP, hnRNP Q, and EPRS genes (Fig. 5B). Silencing at the protein level was evaluated at



**Fig. 3.** Western-blot analysis of the pulled down proteins. Proteins from infected Huh-7 cell extracts were pulled down with the TGEV 5' and 3' genome ends, separated in SDS-PAGE gels and analyzed by immunoblotting with specific antibodies. (A) Cellular proteins showing a strong preference for the 3' end of the TGEV genome. (B) Cellular proteins showing a binding preference for the 3' end of the genome. (C). Preferential binding of the PTB to the 5' end of the genome. (D) Binding of the viral nucleoprotein to the 5' and 3' ends of the TGEV genome, as a loading control of the pull down output. In the case of hnRNP A1, hnRNP A2B1 and PTB, the different isoforms detected by the corresponding antibodies are indicated with arrowheads.

**Table 2**  
siRNAs used for gene silencing analysis.

siRNA ID <sup>a</sup>	Gene symbol	Full gene target name	Ref. no. <sup>b</sup>	siRNA sequence 5' → 3' <sup>c</sup>
AM4623	Cy3-GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase		Commercial positive control, sequence not available
#4390843		NEG Control #1		Commercial negative control, sequence not available
#4390849	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase		Commercial positive control, sequence not available
s25665	PABP	Poly(A)-binding protein, cytoplasmic 1	#1	CCUAAAUGAUCGCAAAAGUAtt UACUUUGCGAUCAUUUAGGag
s25664	PABP	Poly(A)-binding protein, cytoplasmic 1	#2	AUCCAUGUAUAAUAGCAtt UGCuuuuuuuAUCAAUGGAUtt
s20563	hnRNP Q (SYNCRIP)	Synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein	#1	GAACGAGUGAAGAAGUUAAtt UUAAUUCUUCACUCGUUCca
s20564	hnRNP Q (SYNCRIP)	Synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein	#2	CAAUAGAGGUUAUGCGUUUtt AAACGCAUACCUCUAUUGag
s4767	EPRS	Glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	#1	CGAUGUCAGCAUUUCCGUUtt AACGGAUUGCUGACAUcGtc
s4768	EPRS	Glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	#2	CGUUAGAGCUGAUUUACGAtt UCGUAAAUCAGCUCUAACGcg

<sup>a</sup> ID provided by the manufacturer (Ambion).

<sup>b</sup> Arbitrary reference numbers used in this study.

<sup>c</sup> Sense and antisense sequences are given in upper and lower rows, respectively. All the siRNAs used are synthetic duplexes of 21 nt with 2 nt-protruding 3' ends (in lower case).

120 h after siRNAs transfection, and a reduction higher than 65% was observed for all tested proteins (Fig. 5C).

Viral RNA synthesis was quantified at 36 and 72 h postinfection and a significant effect was observed at 72 h postinfection. This time point corresponds with maximum TGEV PUR46-C11 RNA synthesis in Huh-7 cells. Similar to the replicon system, a reproducible and significant reduction of 2-fold in the viral RNA synthesis was evidenced after silencing of PABP, hnRNP Q and EPRS genes, in comparison with the reference levels from cells transfected with a validated negative control siRNA (Fig. 5D). In accordance with the observation made with the TGEV replicon, a significant increment on viral RNA synthesis of about 2-fold was observed upon GAPDH silencing (Fig. 5D). Virus production was quantified at 72 h postinfection by titrating the supernatants from silenced Huh-7 cells on ST cells. In agreement with the effects observed in viral RNA synthesis, a reproducible reduction in virus titers to 36–50% was observed in cells silenced for PABP, hnRNP Q and EPRS genes, while a 340% increase was detected in cells silenced for the GAPDH gene (Fig. 5D). These results indicate that the silencing of PABP, hnRNP Q, EPRS, and GAPDH genes have a significant impact both on virus RNA synthesis and infectious virus production.

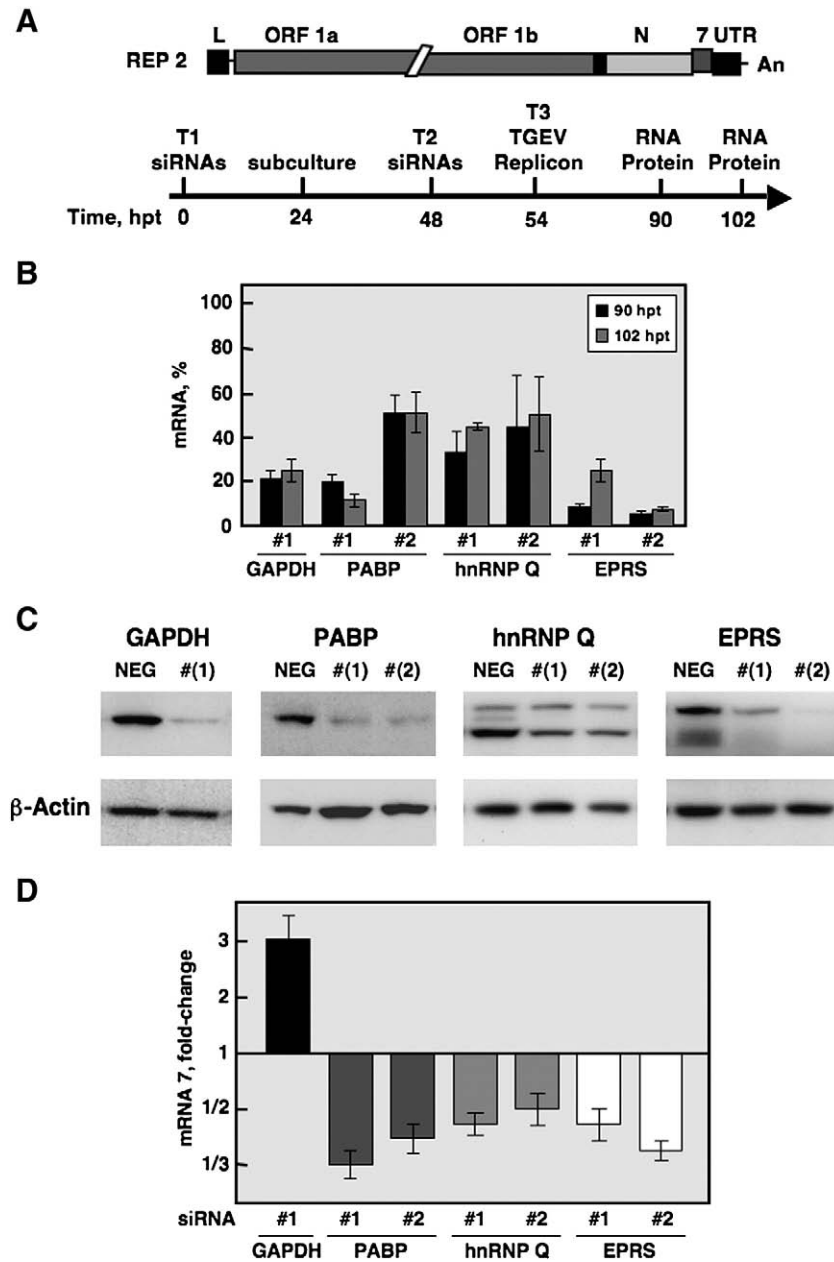
## Discussion

RNA viruses have often evolved to subvert host-cell factors in favor of their own gene expression (Ahlgren et al., 2003; Lai, 1998). During the course of CoV infection, the interactions of specific RNA genome motifs with viral or cellular components probably regulate the initial replicase translation, the switch from translation to RNA synthesis and packaging of progeny genomes. In previous studies in group 2 CoVs, several cellular proteins interacting with different RNA domains at the 5' or 3' UTRs have been identified by UV-crosslinking and RNA affinity protein isolation approaches (Shi and Lai, 2005; Spagnolo and Hogue, 2000; Yu and Leibowitz, 1995). Nevertheless, limited studies have been performed with group 1 CoVs. In this study a set of 10 cellular proteins preferentially binding to the first 500 nt from either the 5' or 3' ends of the TGEV genome was identified and the relevance in virus infection of GAPDH and the 3' end-interacting proteins PABP, hnRNP Q and EPRS, was determined. Considering that the 3' end is the initiation site for replication that starts with the synthesis of the negative strand, the proteins interacting with the 3'-cis-acting replication signals could play a key role at the initial stage of RNA replication. In addition to the critical role of both 5' and 3' genome ends in CoV replication, the genome ends most likely also contain signals that regulate the translation, transcription and RNA stability (Masters, 2006; Ziebuhr, 2005). Thus, the proteins identified in this study could be involved in any of these processes.

A high proportion of the identified proteins belong to the cellular splicing machinery, including the PTB (hnRNP I), that was preferentially purified with the 5' TGEV genome end, and five other hnRNPs (A1, A2B1, A0, U and Q) preferentially associated with the 3' end. Although these proteins are predominantly nuclear factors, most of them can shuttle between the nucleus and the cytoplasm associated to mRNA (Caudy et al., 2003; Ghetti et al., 1992; Mizutani et al., 2000; Myer and Steitz, 1995; Pinol-Roma and Dreyfuss, 1993; Weighardt et al., 1995). On the other hand, nuclear proteins could be translocated to the cytoplasm during infection affecting viral replication, as described for other cytoplasmic RNA viruses (Lai, 1998). An example of this phenomenon was previously reported for the hnRNP A1 that relocates during infection from the nucleus to the sites of MHV RNA synthesis in the cytoplasm (Li et al., 1997). CoV transcription involves the fusion of non-continuous sequences by a discontinuous RNA synthesis mechanism different from conventional RNA splicing but with the same end result. The participation of cellular splicing factors could be critical for assisting this process during CoV transcription by bringing distant RNA sequences in close proximity. Among these splicing factors, PTB, hnRNP A1, and hnRNP Q have been previously shown to interact with MHV genome ends and to be involved in viral RNA synthesis (Choi et al., 2002, 2004; Li et al., 1999; Shen and Masters, 2001; Shi et al., 2000, 2003). In this study, we have found two additional splicing factors, hnRNP A2B1 and hnRNP A0, specifically associated to the 3' end of TGEV genome. In addition, a preferential co-purification of the hnRNP Q with the 3' end of the TGEV genome was observed, whereas the studies on MHV were limited to interaction with the 5' end UTR (Choi et al., 2004). Furthermore, hnRNP Q silencing experiments showed a significant reduction in TGEV RNA synthesis and virus production in agreement with the effects observed after hnRNP Q silencing in MHV infected cells that produced a delay in viral RNA synthesis and syncytium formation (Choi et al., 2004).

In this report, we have described the specific co-purification of p100 with the 3' end of the TGEV genome. An interaction of the p100 with the equine arteritis virus nsp 1, which is essential for mRNA synthesis, has been described (Tijms and Snijder, 2003), but no functional studies were reported on the role of p100 on arterivirus transcription.

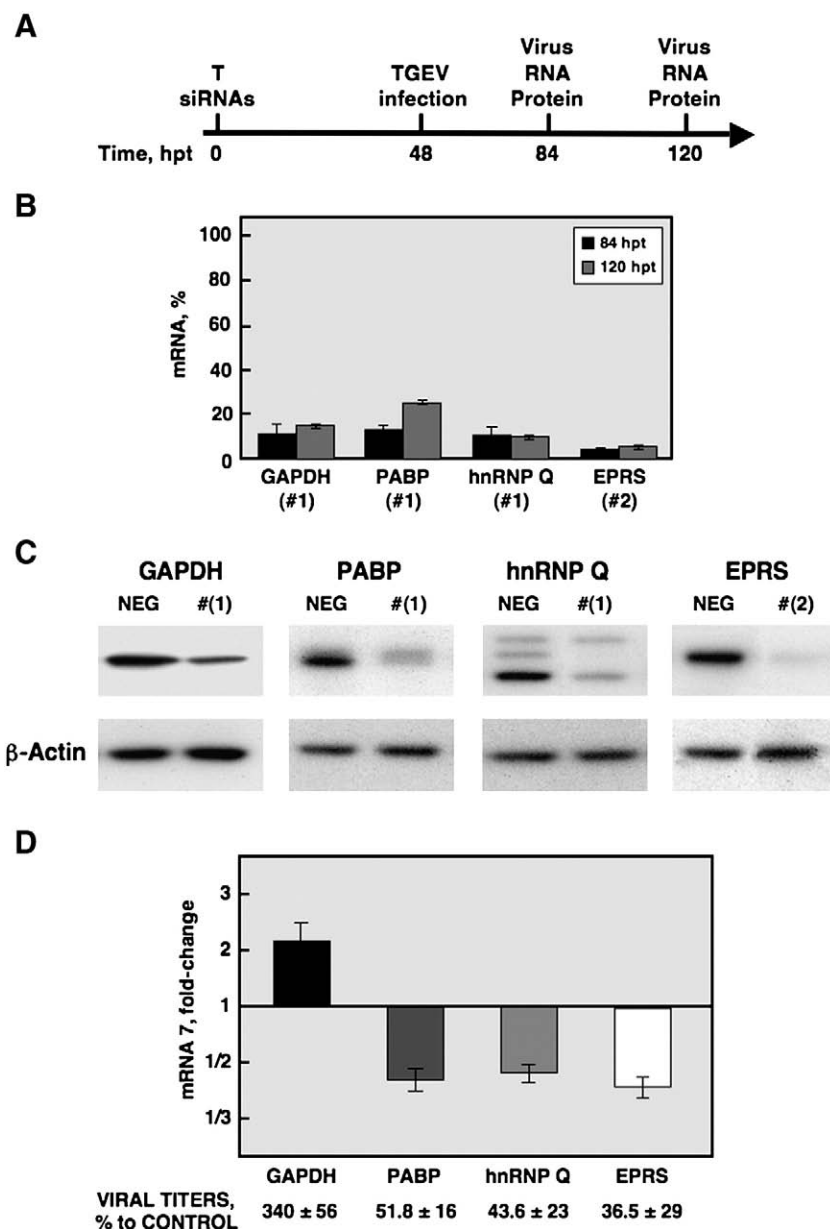
PABP was specifically associated with the 3' end of the TGEV genome and its silencing caused a significant reduction in viral RNA synthesis that correlated with a detectable reduction in virus titers. Binding of PABP to bovine CoV poly(A) tail had been previously reported (Spagnolo and Hogue, 2000). Nevertheless, our studies report the first direct evidence of the effect of this protein in CoV RNA synthesis. CoV genomes mimic cellular mRNAs and are presumed to



**Fig. 4.** TGEV replicon activity in 293T cells after silencing the expression of TGEV 3' end-interacting proteins. (A) Experimental design. The bar on top represents the TGEV-derived replicon (REP 2) that contains the 5' and 3' UTRs, the replicase (ORF 1a and ORF 1b), the nucleoprotein (N), and the 7 genes (Almazán et al., 2004). The time-line of the silencing and phenotypic assay is represented below. The time points refer to hours after the first transfection (hpt) of the siRNAs. 293T cells were transfected (T1) with either a validated negative control siRNA, an siRNA against the GAPDH gene (silencing positive control), or the siRNAs against the target genes (Table 2), seeded over poly-lysine-treated 96-well plates, and re-transfected with the same siRNAs (T2) before the transfection with the TGEV replicon (T3). The time points at which the RNA and proteins were extracted to evaluate the silencing and replicon activity are also indicated. (B) Silencing of cellular genes at the mRNA level. The percentage of mRNA remaining after the silencing of target genes PABP, hnRNP Q and EPRS or the control gene GAPDH was quantified by Q-RT-PCR, in comparison to reference levels from cells transfected with a validated negative control siRNA. Two different siRNA sequences (#1 and #2) were transfected separately to silence each target gene. Time points as in panel A. (C) Silencing of cellular genes at the protein level. Total cellular protein was extracted at 102 h after the first transfection of the siRNAs and the silencing was evaluated by immunoblotting. The  $\beta$ -actin was used as loading control. NEG, 293T cells transfected with a validated negative control siRNA (Table 2). (D) Replicon activity in silenced 293T cells. Total RNA was extracted at 36 and 48 h after the transfection of the TGEV replicon (90 and 102 h after the first transfection of the siRNAs, respectively) and the accumulation of viral mRNA 7 was quantified by Q-RT-PCR. Levels of mRNA 7 are represented as the fold-change in comparison to reference levels from cells transfected with a negative control siRNA. Only the time point (36 or 48 h after transfection of the replicon) in which the effect on the replicon activity was the highest is shown. The experiment was performed three times and the data represent the average of triplicates. Standard deviation is indicated as error bars.

translate their genomes in a cap and poly(A)-dependent manner. The binding of cap-recognizing factors to the 5' end and the interaction of the PABP with the poly(A) tail, could circularize the viral genome for translation. This mechanism would favor the recycling of ribosomes, the selection of complete molecules as templates and the controlled regulation of the switch between translation and RNA synthesis that occurs in opposite directions.

A novel finding of this study is the preferential association of EPRS protein to the 3' end of the TGEV genome and the reduction in TGEV RNA synthesis and virus titers after silencing the expression of this protein. Aminoacyl-tRNA synthetases are ancient enzymes that catalyze the amino acid addition to cognate tRNAs (Ibba and Soll, 2000). In vertebrates, these enzymes have acquired features that are absent in ancestral forms including additional



**Fig. 5.** Effect of silencing the expression of 3' end-interacting proteins on TGEV infection. (A) Time-line of the silencing and phenotypic assay in Huh-7 cells. The time points refer to hours after siRNAs transfection (hpt). The cells were transfected with siRNAs against the target genes (T) (Table 2) and infected with the TGEV PUR46-C11 strain at 48 h posttransfection. Total RNA and protein were recovered at the indicated times to analyze the silencing and the viral phenotype. (B) Analysis of candidate gene silencing at the mRNA level in Huh-7 cells. The percentage of mRNA remaining after the silencing of control gene GAPDH and the target genes PABP, hnRNP Q and EPRS was quantified by Q-RT-PCR, in comparison to reference levels from cells transfected with a validated negative control siRNA. (C) Silencing of candidate genes at the protein level. The silencing was evaluated at 120 h posttransfection by immunoblotting. The  $\beta$ -actin was used as loading control. NEG, Huh-7 cells transfected with a validated negative control siRNA (Table 2). (D) Virus RNA synthesis and virus production in silenced Huh-7 cells. Total RNA was extracted at 36 and 72 h postinfection (84 and 120 h posttransfection, respectively) and the accumulation of viral mRNA7 was quantified by Q-RT-PCR. Levels of mRNA 7 are represented as the fold-change in comparison to reference levels from cells transfected with a validated negative control siRNA. Virus production was quantified by titration of the supernatants on ST cells. The figure shows the effect observed on RNA synthesis and virus production at 72 h postinfection when the phenotype was more evident. The experiment was performed three times and the data represent the average of triplicates. Standard deviation is indicated as error bars.

functions unrelated to aminoacylation (Jia et al., 2008; Sampath et al., 2004). Aminoacyl-tRNA synthetases play key roles in different viral systems, such as the packaging of primer tRNAs in retroviruses (Cen et al., 2002) or catalyzing the aminoacylation of tRNA-like domains at the 3' end of some plant RNA viruses to control plant virus replication (Dreher, 2008; Kohl and Hall, 1974). With our data, it is possible to speculate that the binding of EPRS to a specific RNA motif at the 3' termini of the TGEV genome could be a strategy to efficiently compete with cellular mRNAs for the translation machinery by recruiting a key enzyme and providing the substrate for protein synthesis.

Silencing of GAPDH led to a positive effect on TGEV RNA synthesis and virus production. Furthermore, an interaction of GAPDH with at least the 5' end of the TGEV genome has been identified (data not shown), suggesting the possibility that the effect observed on RNA synthesis and virus production could be mediated by this interaction. GAPDH is a glycolytic enzyme that also has RNA-binding properties and plays different roles by interacting with the RNA genome of different viruses. GAPDH has been involved in suppression of cap-independent translation in picornaviruses by destabilization of the IRES structure (Yi et al., 2000), and is a member of the replicase complex of tombusviruses, where it may regulate viral asymmetric



RNA synthesis (Wang and Nagy, 2008). Interestingly, a reduction in GAPDH gene expression has been found in SARS-CoV infected cells and in cells transfected with nsp1 (Kamitani et al., 2006; Wathelet et al., 2007). In our study the positive effect on TGEV RNA synthesis and virus production after GAPDH silencing is in agreement with a possible role of GAPDH in counteracting viral infection.

The effects of silencing the cellular genes described in this work on TGEV replicon activity were reproducible and statistically significant with two different siRNA sequences per gene and were proportional to the silencing potency of each siRNA sequence. The phenotypes observed in the TGEV replicon system were also corroborated with the infectious virus, confirming that the effects observed were reproducible, irrespective of the different experimental systems and cell types. Furthermore, although the differences in viral RNA synthesis and titers observed after the silencing of the host candidate genes could be considered moderate, similar quantitative results have been reported in other viral systems (Hara et al., 2009; Pettit Kneller et al., 2009). Overall, our data suggest an effect of GAPDH, PABP, hnRNP Q, and EPRS on TGEV RNA synthesis and virus production.

## Materials and methods

### Cells and viruses

Baby hamster kidney cells stably transformed with the porcine aminopeptidase N gene (BHK-pAPN) to make them susceptible to TGEV (Delmas et al., 1993) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) (Biowhittaker, Berviers, Belgium) and geneticin (1.5 mg/ml) as a selection agent. Swine testis (ST) cells (McClurkin and Norman, 1966) were grown in DMEM supplemented with 10% FBS. Human liver derived Huh-7 cells were kindly provided by R. Bartenschlager (University of Heidelberg, Germany) and were grown in DMEM supplemented with 10% of heat-inactivated FBS. Human 293T cells were grown in DMEM supplemented with 5% FBS. TGEV PUR46-MAD strain (Sánchez et al., 1990) was used to infect BHK-pAPN and ST cells and TGEV PUR46-C11 strain (Sánchez et al., 1999) to infect Huh-7 cells. Virus titration was performed on ST cell monolayers as previously described (Jiménez et al., 1986).

### DNA constructs

To generate a DNA template for the *in vitro* transcription of a precise TGEV 5' end, the plasmid pM33L-637G (Galán et al., 2005) that contains the M33L minigenome was used as template to amplify the first 504 nt of the TGEV genome. The PCR was performed with the oligonucleotides XmaI-SP6p-G-5'TGEV-VS that includes the SP6 promoter and 5'TGEV-504-RS (Table 3). The resulting amplicon was purified with the QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN), precipitated with 0.1 vol of sodium acetate 3M pH 5.2 and 2.5 vol of cold 100%

ethanol (sodium acetate-ethanol precipitation), resuspended in Tris-HCl 10 mM pH 7.5, and then used as template for the *in vitro* transcription reactions. The last 493 nt at the 3' end of TGEV genome were amplified from the plasmid pM33L-637G using the oligonucleotides XmaI-T7p-GGG-ORF7-VS (Table 3) that introduces the T7 promoter preceding the viral sequence and HindIII-poly(A)-RS (Table 3) that includes a 25 nt poly(A) tail. The PCR amplicon was digested with XmaI and HindIII and cloned into the same restriction sites of the plasmid pM33L-637G to generate the plasmid pM33L-3'-template. The plasmid pM33L-3'-template was linearized with HindIII, deproteinized by phenol chloroform extraction, precipitated by sodium acetate-ethanol precipitation, and resuspended in the reaction buffer of the Mung Bean nuclease (New England Biolabs). In order to generate a precise TGEV genome 3' end, the linearized plasmid pM33L-3'-template was then treated with Mung Bean nuclease to degrade the three-nucleotide single-strand extension generated after the HindIII digestion, following the manufacturer's conditions. The template was deproteinized by phenol chloroform extraction, precipitated by sodium acetate-ethanol precipitation, resuspended in Tris-HCl 10 mM pH 7.5, and then used for the *in vitro* transcription reactions. In all cases the PCR reactions were performed with the Platinum Pfx DNA polymerase (Invitrogen) following the manufacturer's recommended conditions. All cloning steps were checked by sequencing the PCR-amplified fragments and cloning junctions.

The generation of the TGEV-derived replicon REP 2 has been previously described (Almazán et al., 2004).

### *In vitro* transcription

*In vitro* transcription reactions were performed from 1 µg of linearized pM33L-3'-template or 200 ng of the PCR amplicon containing the 5'TGEV end using the SP6/T7 Transcription kit (Roche). Biotin-14-CTP (Invitrogen) was added at a final concentration of 0.16 mM in a 1:6.25 ratio to unlabeled CTP. The transcription reactions were incubated 2 h at 37 °C and treated with 10 U of DNaseI during 30 min at 37 °C. The resulting transcripts were purified with the RNeasy kit (QIAGEN) following the RNA cleanup protocol, analyzed by denaturing electrophoresis in 1% (w/vol) agarose-2.2 M formaldehyde gels and spectrophotometrically quantified.

### Cell extracts

ST, BHK-pAPN and Huh-7 cells were grown in 15-cm diameter dishes to confluence and infected at a MOI of 10 with TGEV PUR46-MAD (for ST and BHK-pAPN cells) or at a MOI of 5 with TGEV PUR46-C11 (for Huh-7 cells). After an adsorption period of 1 h the inoculum medium was replaced by fresh medium and the cell extracts were prepared at 7 and 36 h postinfection with the TGEV PUR46-MAD and PUR46-C11 viruses, respectively. The cells were then washed with cold PBS, scrapped off the plates, centrifuged at 1500 ×g for 10 min at 4 °C,

**Table 3**  
Oligonucleotides used for PCR amplifications and Q-RT-PCR analysis.

Oligonucleotide <sup>a</sup>	Method <sup>b</sup>	Oligonucleotide sequence 5' → 3' <sup>c</sup>	Amplicon
XmaI-SP6p-G-5'TGEV-VS	PCR 5'TGEV	cgcgCCCGGGATTTAGGTGACACTATA(G)ACTTTTAAAGTAAAGTGAGTGTAGC	557 bp
5'TGEV-504-RS	PCR 5'TGEV	CACCAATGACGTAGTGATCCTTACG	
XmaI-T7p-GGG-ORF7-VS	PCR 3'TGEV	cgcgCCCGGGTAATACGACTCACTATA(G)GGATGCTGTATTATTACAGTTTAAATC	545 bp
HindIII-poly(A)-RS	PCR 3'TGEV	gccgAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTATCACTATC	
TGEV-Leader-VS	Q-RT-PCR mRNA 7	CGTGGCTATATCTCTCTTTTACTTTAACTAG	
TGEV-7(38)-RS	Q-RT-PCR mRNA 7	AAACTGTAATAATACAGCATGGAGAA	
TGEV mRNA 7 (TaqMan MGB probe)	Q-RT-PCR mRNA 7	FAM-CGAATCAACGAGATGCT-MGB	

<sup>a</sup> VS, virus sense. RS, reverse sense. MGB, minor groove binder group.

<sup>b</sup> PCR 5' (or 3') TGEV, PCR for amplification of the TGEV genome ends to generate transcription templates. Q-RT-PCR mRNA 7, primers and probe used for the quantification of the viral subgenomic mRNA 7.

<sup>c</sup> Restriction endonuclease sites used for cloning are in italics. Additional sequences at the 5' of the restriction site are in lower case. Transcription promoters are in bold. Transcription initiation sites are in brackets. Template sequence corresponding to the poly(A) is underlined.

and the cell pellets were resuspended in cold PBS ( $4 \times 10^7$  cells/ml) and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . To generate cytoplasmic extracts,  $4 \times 10^7$  cells were pelleted and resuspended in 400  $\mu\text{l}$  of the extraction buffer [10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, protease inhibitor cocktail (Roche)] at  $4^\circ\text{C}$  by gentle pipetting, incubated at  $4^\circ\text{C}$  for 15 min, and after addition of 25  $\mu\text{l}$  of 10% NP-40, vortexed vigorously for 10 s and centrifuged at  $13,000 \times g$  for 30 s. The supernatant was collected and stored in 10% glycerol at  $-80^\circ\text{C}$ . Total protein concentration was determined with the Coomassie Plus Protein Assay (Pierce) and the extracts were aliquoted to avoid repeated freeze/thaw cycles.

#### RNA affinity chromatography

Cell extracts (600  $\mu\text{g}$ ) were diluted 1:1 in binding-washing (BW) buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5% glycerol, 0.01% NP-40) and pre-cleared three times with 20  $\mu\text{l}$  of Streptavidin Sepharose beads (Streptavidin Sepharose High Performance, Amersham) during 4 h. All the incubations were performed at  $4^\circ\text{C}$  in an orbital shaker and the beads were collected by centrifugation at  $440 \times g$ . Biotinylated RNA (10  $\mu\text{g}$ ) was diluted in 200  $\mu\text{l}$  of RNA-binding buffer (5 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl) and incubated with 20  $\mu\text{l}$  of fresh Streptavidin Sepharose beads during 1 h. The immobilized RNA was washed three times for 15 min with 200  $\mu\text{l}$  of BW buffer and then incubated with the pre-cleared protein extract overnight. The RNA-protein complexes were washed three times for 15 min with 200  $\mu\text{l}$  of BW buffer, pulled down and resuspended in 30  $\mu\text{l}$  of NuPage Sample buffer (Invitrogen) by incubation for 10 min at  $65^\circ\text{C}$ . The beads were centrifuged and the supernatant containing RNA interacting proteins was recovered and analyzed by denaturing electrophoresis using NuPAGE 4–12% Bis-Tris gels and MOPS SDS Running buffer (Invitrogen). The gels were washed three times in deionized water, stained with Coomassie blue Simply Blue Safe Stain (Invitrogen), and the protein bands of interest were excised from the gels for their identification by mass spectrometry.

#### Identification of proteins by mass spectrometry

Excised protein bands were in-gel digested with sequencing grade modified porcine trypsin (Promega). Peptides were extracted from gel pieces with 100  $\mu\text{l}$  of 50% acetonitrile in 0.1% formic acid, dried by speed vacuum centrifugation and frozen. Peptides were dissolved in 7  $\mu\text{l}$  of 0.1% formic acid and analyzed on a Micromass Q-TOF Micro mass spectrometer (Manchester, UK) coupled to a CAPLC HPLC system at the Oxford Central Proteomics Facility of the Sir William Dunn School of Pathology of the University of Oxford (UK). Alternatively, protein digestions were eluted in 0.5% of trifluoroacetic acid, dried by speed vacuum centrifugation and resuspended in 4  $\mu\text{l}$  of MALDI solution. A 0.8  $\mu\text{l}$  aliquot of each peptide mixture was deposited and dried onto a 386-well OptiTOF™ plate (Applied Biosystems) and co-crystallized with 0.8  $\mu\text{l}$  of matrix solution (3 mg/ml CHCA in MALDI solution). Samples were analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in an ABI 4800 MALDI TOF/TOF mass spectrometer (Applied Biosystems) at the Proteomics Facility of the Biotechnology National Centre (CNB-CSIC) of Madrid (Spain). Data were analyzed using MassLynx 4.0 (Micromass, Manchester, UK) or the ABI 4000 series explorer Software v3.6 and searches were performed with the MASCOT software v2.1 (Matrix Science) against the MSDB from the non-redundant NCBI protein database with a mass tolerance of 100 and 200 ppm. No restrictions were imposed for protein molecular weight, although in some cases taxonomy restrictions for the human or mammalian databases were included.

#### Silencing analysis using the TGEV replicon system

The transfection and silencing efficiencies of siRNAs were optimized in human 293T cells using a Cy3-labeled positive control

siRNA targeting the human GAPDH gene (Table 2). In the optimized conditions, 293T cells were grown to 60% confluence in 35-mm-diameter plates and transfected with 15 nM of Silencer Select siRNAs (Ambion, Table 2) and 7.2  $\mu\text{l}$  of RNAiMax (Invitrogen) according to the manufacturer's specifications. Cells were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 24 h and then trypsinized and seeded on 96-well plates treated with poly-lysine at a confluence of  $4 \times 10^4$  cells per well. The cells were re-transfected with 10 nM of siRNAs at 48 h after the first transfection and incubated for 5 h at  $37^\circ\text{C}$ . In the case of EPRS siRNA #1 (Table 2), doses of 50 and 25 nM (for the first and second siRNA transfections, respectively) were required to achieve an efficient silencing and a significant effect on the TGEV replicon activity. Finally, the transfection medium was discarded and the cells were transfected with 200 ng of the TGEV-derived replicon REP 2 and 0.48  $\mu\text{l}$  of Lipofectamine 2000 (Invitrogen) as previously described (Almazán et al., 2004). Total RNA and protein were collected at 36 and 48 h after the replicon transfection for further analysis.

#### Silencing analysis with the infectious TGEV

Human Huh-7 cells, susceptible to TGEV PUR46-C11 strain, were selected to analyze the effect of silencing host candidate genes on TGEV infection. After optimization of the transfection and silencing using a Cy3-labeled positive control siRNA targeting the human GAPDH gene (Table 2), the reverse transfection method was chosen. Briefly, for each well of a 24-well plate,  $4.8 \times 10^4$  cells were incubated in suspension with 10 nM of Silencer Select siRNAs (Ambion, Table 2) and 2  $\mu\text{l}$  of siPORT Amine (Ambion) diluted in 25  $\mu\text{l}$  of Opti-MEM I Reduced Serum Medium (GibcoBRL-Invitrogen). Then, cells were plated onto each well using DMEM medium with 10% of heat-inactivated FBS. Cells were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 48 h and then infected with the TGEV PUR46-C11 at a MOI of 5. Total RNA, protein and cell supernatants were collected at 36 and 72 h postinfection for further analysis.

#### Analysis of cellular gene expression and viral RNA synthesis

Cellular gene expression and viral RNA synthesis were quantified by Q-RT-PCR. Total cDNA was synthesized with random hexamers from 100 ng of total RNA using the High Capacity cDNA Transcription kit (Applied Biosystems). Cellular gene expression was analyzed using TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems) specific for human hnRNP Q (Hs00749309\_s1 synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein), EPRS (Hs00270083\_m1 Inventoried EPRS, glutamyl-prolyl-tRNA synthetase), PABP (Hs00743792\_s1 Inventoried PABPC1, poly(A)-binding protein, cytoplasmic 1) or GAPDH (Hs99999905\_m1 Inventoried glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) genes. To analyze viral RNA synthesis a custom TaqMan assay (Applied Biosystems) specific for the TGEV mRNA 7 (Table 3) was used. Data were acquired with an ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) and analyzed with ABI PRISM 7000 SDS version 1.0 software. Relative gene expression referred to cells treated with a validated negative control siRNA (Ambion, Table 2). The data represent the average of biological triplicates.

#### Western-blot analysis

Cell lysates or pulled down RNA-binding proteins were analyzed by denaturing electrophoresis in NuPAGE 4–12% Bis-Tris gels with MOPS SDS Running buffer (Invitrogen). Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond-C Extra Nitrocellulose, Amersham Biosciences) with a Bio-Rad Mini protean II electroblotting apparatus at 100 V for 1 h in Bis-Tris transfer buffer (25 mM Bis-Tris, 25 mM Bicine, 1 mM EDTA) containing 20% methanol. Membranes were blocked for 1 h with 5% dried skimmed milk in TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) and then probed with specific antibodies.

Primary antibodies for hnRNP A1 (rabbit polyclonal E17), hnRNP Q (mouse mAb I8E4:sc-56703), hnRNP A2B1 (goat polyclonal G-16:sc-10036), and hnRNP A0 (goat polyclonal G-17:sc-16509) were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Antibodies for hnRNP U (rabbit polyclonal ab20666), EPRS (rabbit polyclonal ab31531), GAPDH (rabbit polyclonal ab9485), and  $\beta$ -actin (mouse mAb ab8226) were purchased from Abcam. The hybridoma BB7 against PTB and the p100 transcriptional co-activator guinea pig polyclonal antiserum GP25 were purchased from the ATCC and Progen Biotechnik, respectively. The PABP rabbit polyclonal antiserum was kindly provided by Dra. Amelia Nieto (CNB-CSIC, Madrid). To detect the TGEV N protein the mouse mAb 3DC10 was used (Martín Alonso et al., 1992). Bound primary antibodies were detected with horseradish peroxidase-conjugated antibodies against the different species and the Immobilon Western chemiluminescent substrate (Millipore), following the manufacturer's recommendations.

## Acknowledgments

We thank S. Zúñiga for critically reading the manuscript and helpful discussions. This work was supported by grants from the Ministry of Science and Innovation of Spain (BIO2007-60978 and CIT-01000-2007-8), the Community of Madrid (S-SAL-0185-2006), the European Community (Frame VII, RiViGene project, SSPE-CT-2005-022639) and Fort Dodge Veterinaria. C. G. received a contract supported by grants from the Ministry of Science and Innovation of Spain (CIT-01000-2007-8) and the Community of Madrid (S-SAL-0185-2006).

## References

- Ahlquist, P., Noueiry, A.O., Lee, W.M., Kushner, D.B., Dye, B.T., 2003. Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J. Virol.* 77 (15), 8181–8186.
- Almazán, F., Galán, C., Enjuanes, L., 2004. The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J. Virol.* 78 (22), 12683–12688.
- Brierley, L., Digard, P., Inglis, S.C., 1989. Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot. *Cell* 57 (4), 537–547.
- Caudy, A.A., Ketting, R.F., Hammond, S.M., Denli, A.M., Bathoorn, A.M., Tops, B.B., Silva, J.M., Myers, M.M., Hannon, G.J., Plasterk, R.H., 2003. A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature* 425 (6956), 411–414.
- Cen, S., Javanbakht, H., Kim, S., Shiba, K., Craven, R., Rein, A., Ewalt, K., Schimmel, P., Musier-Forsyth, K., Kleiman, L., 2002. Retrovirus-specific packaging of aminoacyl-tRNA synthetases with cognate primer tRNAs. *J. Virol.* 76 (24), 13111–13115.
- Choi, K.S., Huang, P., Lai, M.M., 2002. Polypyrimidine-tract-binding protein affects transcription but not translation of mouse hepatitis virus RNA. *Virology* 303 (1), 58–68.
- Choi, K.S., Mizutani, A., Lai, M.M., 2004. SYNCRIP, a member of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein family, is involved in mouse hepatitis virus RNA synthesis. *J. Virol.* 78 (23), 13153–13162.
- Delmas, B., Gelfi, J., Sjöström, H., Noren, O., Laude, H., 1993. Further characterization of aminopeptidase-N as a receptor for coronaviruses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 342, 293–298.
- Dreher, T.W., 2008. Role of tRNA-like structures in controlling plant virus replication. *Virus Res.* 139 (2), 217–298.
- Drosten, C., Günther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R.A.M., Berger, A., Burguiere, A.M., Cinatl, J., Eickmann, M., Esciuri, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J.C., Müller, S., Rickerts, W., Stürmer, M., Viet, S., Klenk, H.D., Osterhaus, A.D.M.E., 2003. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348 (20), 1967–1976.
- Elmen, J., Thonberg, H., Ljungberg, K., Frieden, M., Westergaard, M., Xu, Y., Wahren, B., Liang, Z., Orum, H., Koch, T., Wahlestedt, C., 2005. Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res.* 33 (1), 439–447.
- Enjuanes, L., Almazán, F., Sola, I., Zúñiga, S., 2006. Biochemical aspects of coronavirus replication and virus–host interaction. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 211–230.
- Enjuanes, L., Gorbaleña, A.E., de Groot, R.J., Cowley, J.A., Ziebuhr, J., Snijder, E.J., 2008. The Nidovirales. In: Mahy, B.W.J., Van Regenmortel, M., Walker, P., Majumder-Russell, D. (Eds.), *Encyclopedia of Virology*, 3rd ed. Elsevier Ltd., Oxford, pp. 419–430.
- Enjuanes, L., Spaan, W., Snijder, E., Cavanagh, D., 2000. In: van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carsten, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., McGeoch, D.J., Maniloff, J., Mayo, M.A., Pringle, C.R., Wickner, R.B. (Eds.), *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses*. Academic Press, San Diego, California, pp. 827–834.
- Escors, D., Izeta, A., Capiscol, C., Enjuanes, L., 2003. Transmissible gastroenteritis coronavirus packaging signal is located at the 5' end of the virus genome. *J. Virol.* 77 (14), 7890–7902.
- Galán, C., Enjuanes, L., Almazán, F., 2005. A point mutation within the replicase gene differentially affects coronavirus genome versus minigenome replication. *J. Virol.* 79 (24), 15016–15026.
- Ghetti, A., Pinol-Roma, S., Michael, W.M., Morandi, C., Dreyfuss, G., 1992. hnRNP I, the polypyrimidine tract-binding protein: distinct nuclear localization and association with hnRNAs. *Nucleic Acids Res.* 20 (14), 3671–3678.
- Hara, H., Aizaki, H., Matsuda, M., Shinkai-Ouchi, F., Inoue, Y., Murakami, K., Shoji, I., Kawakami, H., Matsuura, Y., Lai, M.M.C., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T., 2009. Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J. Virol.* 83 (10), 5137–5147.
- Ibba, M., Soll, D., 2000. Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 617–650.
- Imbert, I., Guillemot, J.C., Bourhis, J.M., Bussetta, C., Coutard, B., Egloff, M.P., Ferron, F., Gorbaleña, A.E., Canard, B., 2006. A second, non-canonical RNA-dependent RNA polymerase in SARS coronavirus. *EMBO J.* 25 (20), 4933–4942.
- Izeta, A., Smerdou, C., Alonso, S., Penzes, Z., Méndez, A., Plana-Durán, J., Enjuanes, L., 1999. Replication and packaging of transmissible gastroenteritis coronavirus-derived synthetic minigenomes. *J. Virol.* 73 (2), 1535–1545.
- Jia, J., Arif, A., Ray, P.S., Fox, P.L., 2008. WHEP domains direct noncanonical function of glutamyl-prolyl tRNA synthetase in translational control of gene expression. *Mol. Cell* 29 (6), 679–690.
- Jiménez, G., Correa, I., Melgosa, M.P., Bullido, M.J., Enjuanes, L., 1986. Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutralization. *J. Virol.* 60 (1), 131–139.
- Kamitani, W., Narayanan, K., Huang, C., Lokugamage, K., Ikegami, T., Ito, N., Kubo, H., Makino, S., 2006. Severe acute respiratory syndrome coronavirus ns1 protein suppresses host gene expression by promoting host mRNA degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (34), 12885–12890.
- Kohl, R.J., Hall, T.C., 1974. Aminoacylation of RNA from several viruses: amino acid specificity and differential activity of plant, yeast and bacterial synthetases. *J. Gen. Virol.* 25 (2), 257–261.
- Lai, M.M.C., 1998. Cellular factors in the transcription and replication of viral RNA genomes: a parallel to DNA-dependent RNA transcription. *Virology* 244 (1), 1–12.
- Li, H.P., Zhang, X., Duncan, R., Comai, L., Lai, M.M.C., 1997. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 binds to the transcription-regulatory region of mouse hepatitis virus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (18), 9544–9549.
- Li, H.P., Huang, P., Park, S., Lai, M.M.C., 1999. Polypyrimidine tract-binding protein binds to the leader RNA of mouse hepatitis virus and serves as a regulator of viral transcription. *J. Virol.* 73 (1), 772–777.
- Martín Alonso, J.M., Balbin, M., Garwes, D.J., Enjuanes, L., Gascon, S., Parra, F., 1992. Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus nucleoprotein. *Virology* 188 (1), 168–174.
- Masters, P.S., 2006. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 66, 193–292.
- McClurkin, A.W., Norman, J.O., 1966. Studies on transmissible gastroenteritis of swine. II. Selected characteristics of a cytopathogenic virus common to five isolates from transmissible gastroenteritis. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 30 (7), 190–198.
- Mizutani, A., Fukuda, M., Ibata, K., Shiraishi, Y., Mikoshiba, K., 2000. SYNCRIP, a cytoplasmic counterpart of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R, interacts with ubiquitous synaptotagmin isoforms. *J. Biol. Chem.* 275 (13), 9823–9831.
- Myer, V.E., Steitz, J.A., 1995. Isolation and characterization of a novel, low abundance hnRNP protein: A0. *RNA* 1 (2), 171–182.
- Nanda, S.K., Leibowitz, J.L., 2001. Mitochondrial aconitase binds to the 3' untranslated region of the mouse hepatitis virus genome. *J. Virol.* 75 (7), 3352–3362.
- Perlman, S., Lane, T.E., Buchmeier, M.J., 2000. Coronavirus: hepatitis, peritonitis, and central nervous system disease. In: Cunningham, M.W., Fujinami, R.S. (Eds.), *Coronavirus: Hepatitis, Peritonitis, and Central Nervous System Disease*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 331–348.
- Pettit Kneller, E.L., Connor, J.H., Lyles, D.S., 2009. hnRNPs relocate to the cytoplasm following infection with vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 83 (2), 770–780.
- Pinol-Roma, S., Dreyfuss, G., 1993. hnRNP proteins: localization and transport between the nucleus and the cytoplasm. *Trends Cell. Biol.* 3 (5), 151–155.
- Sampath, P., Mazumder, B., Seshadri, V., Gerber, C.A., Chavatte, L., Kinter, M., Ting, S.M., Dignam, J.D., Kim, S., Driscoll, D.M., Fox, P.L., 2004. Noncanonical function of glutamyl-prolyl-tRNA synthetase: gene-specific silencing of translation. *Cell* 119 (2), 195–208.
- Sánchez, C.M., Jiménez, G., Laviada, M.D., Correa, I., Suñé, C., Bullido, M.J., Gebauer, F., Smerdou, C., Callebaut, P., Escribano, J.M., Enjuanes, L., 1990. Antigenic homology among coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus. *Virology* 174 (2), 410–417.
- Sánchez, C.M., Izeta, A., Sanchez-Morgado, J.M., Alonso, S., Sola, I., Balasch, M., Plana-Durán, J., Enjuanes, L., 1999. Targeted recombination demonstrates that the spike gene of transmissible gastroenteritis coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence. *J. Virol.* 73 (9), 7607–7618.
- Schelle, B., Karl, N., Ludewig, B., Siddell, S.G., Thiel, V., 2005. Selective replication of coronavirus genomes that express nucleocapsid protein. *J. Virol.* 79 (11), 6620–6630.
- Shen, X., Masters, P.S., 2001. Evaluation of the role of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 as a host factor in murine coronavirus discontinuous transcription and genome replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (5), 2717–2722.
- Shi, S.T., Lai, M.M., 2005. Viral and cellular proteins involved in coronavirus replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 287, 95–131.
- Shi, S.T., Huang, P., Li, H.P., Lai, M.M., 2000. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 regulates RNA synthesis of a cytoplasmic virus. *EMBO J.* 19 (17), 4701–4711.
- Shi, S.T., Yu, G.Y., Lai, M.M., 2003. Multiple type A/B heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) can replace hnRNP A1 in mouse hepatitis virus RNA synthesis. *J. Virol.* 77 (19), 10584–10593.

- Snijder, E.J., Bredenbeek, P.J., Dobbe, J.C., Thiel, V., Ziebuhr, J., Poon, L.L.M., Guan, Y., Rozanov, M., Spaan, W.J.M., Gorbalenya, A.E., 2003. Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J. Mol. Biol.* 331 (5), 991–1004.
- Spagnolo, J.F., Hogue, B.G., 2000. Host protein interactions with the 3' end of bovine coronavirus RNA and the requirement of the poly(A) tail for coronavirus defective genome replication. *J. Virol.* 74 (11), 5053–5065.
- Tijms, M.A., Snijder, E.J., 2003. Equine arteritis virus non-structural protein 1, an essential factor for viral subgenomic mRNA synthesis, interacts with the cellular transcription co-factor p100. *J. Gen. Virol.* 84 (Pt. 9), 2317–2322.
- Vijaykrishna, D., Smith, G.J., Zhang, J.X., Peiris, J.S., Chen, H., Guan, Y., 2007. Evolutionary insights into the ecology of coronaviruses. *J. Virol.* 81 (8), 4012–4020.
- Wang, R.Y., Nagy, P.D., 2008. Tomato bushy stunt virus co-opts the RNA-binding function of a host metabolic enzyme for viral genomic RNA synthesis. *Cell Host Microbe* 3 (3), 178–187.
- Wathelet, M.G., Orr, M., Frieman, M.B., Baric, R.S., 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus evades antiviral signaling: role of nsp1 and rational design of an attenuated strain. *J. Virol.* 81 (21), 11620–11633.
- Weighardt, F., Biamonti, G., Riva, S., 1995. Nucleo-cytoplasmic distribution of human hnRNP proteins: a search for the targeting domains in hnRNP A1. *J. Cell Sci.* 108 (Pt. 2), 545–555.
- Yi, M., Schultz, D.E., Lemon, S.M., 2000. Functional significance of the interaction of hepatitis A virus RNA with glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): opposing effects of GAPDH and polypyrimidine tract binding protein on internal ribosome entry site function. *J. Virol.* 74 (14), 6459–6468.
- Yu, W., Leibowitz, J.L., 1995. Specific binding of host cellular proteins to multiple sites within the 3' end of mouse hepatitis virus genomic RNA. *J. Virol.* 69 (4), 2016–2023.
- Ziebuhr, J., 2005. The coronavirus replicase. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 287, 57–94.
- Ziebuhr, J., Snijder, E.J., Gorbalenya, A.E., 2000. Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J. Gen. Virol.* 81 (Pt. 4), 853–879.





# Immunogenic characterization and epitope mapping of transmissible gastroenteritis virus RNA dependent RNA polymerase

Aitor Nogales<sup>a</sup>, Carmen Galán<sup>a,1</sup>, Silvia Márquez-Jurado<sup>a</sup>, Mónica García-Gallo<sup>b</sup>, Leonor Kremer<sup>b</sup>, Luis Enjuanes<sup>a,\*</sup>, Fernando Almazán<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Molecular and Cell Biology, Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), C/ Darwin 3, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Protein Tools Unit, Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Darwin 3, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

## ABSTRACT

### Article history:

Received 17 December 2010

Received in revised form 28 March 2011

Accepted 5 April 2011

Available online 12 April 2011

### Keywords:

Coronavirus

RNA dependent RNA polymerase

Monoclonal antibodies

Coronavirus RNA synthesis is a sophisticated process performed by a viral multienzymatic replicase complex, together with cellular factors. A key enzyme of this replication complex is the RNA dependent RNA polymerase (RdRp). To study the replication of coronavirus genome, six monoclonal antibodies (mAbs) specific for transmissible gastroenteritis virus (TGEV) RdRp were generated and characterized. His-tagged RdRp was expressed in baculovirus, purified and used as immunogen to produce mAbs. The TGEV RdRp was recognized by these mAbs in the context of virus infection by immunofluorescence analysis and Western blot. Epitope mapping by Pepscan indicated that RdRp mAbs recognized four non-overlapping linear epitopes located in a 62-amino acid region of the N-terminal domain, suggesting that this region may constitute an immunodominant domain. The availability of TGEV RdRp mAbs will be instrumental to study coronavirus replication and to analyze the function of RdRp in pathogenesis.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Transmissible gastroenteritis virus (TGEV) is an enveloped, single-strand positive sense RNA virus that belongs to the genus  $\alpha$  of the *Coronaviridae* family within the *Nidovirales* order (de Groot et al., 2010; Enjuanes et al., 2008) (see <http://talk.ictvonline.org/media/g/vertebrate-2008/default.aspx> for official coronavirus taxonomy). Coronavirus (CoV) infections cause a variety of enteric and respiratory diseases relevant in animal and human health, being of special interest the severe acute respiratory syndrome (SARS) in humans (Drosten et al., 2003; Perlman et al., 2000). The CoV genome is about 30 kb in length, the largest RNA virus genome known (Enjuanes et al., 2008; Masters, 2006). The 5' two-thirds of the genome contain the replicase gene that is made up of two overlapping open reading frames (ORFs), ORF 1a and ORF 1b, the latter being translated by a ribosomal frameshift mechanism (Brierley et al., 1987, 1989). Both ORFs are translated into two co-amino-terminal polyproteins, pp1a and pp1ab, which are cleaved autoproteolytically into up to 16 mature

products (nsp1–nsp16) that form the replication–transcription complex, probably together with the participation of cellular factors (Enjuanes et al., 2006; Galan et al., 2009; Masters, 2006; Ziebuhr, 2005; Ziebuhr et al., 2000). CoV replication and transcription are complex processes that take place at cytoplasmic double membrane vesicles (DMVs) and involve coordinated processes of both continuous and discontinuous RNA synthesis (Gosert et al., 2002; Knoop et al., 2008; Masters, 2006; Snijder et al., 2006; Zúñiga et al., 2004).

A key enzyme required for both genome replication and transcription is the RNA dependent RNA polymerase (RdRp) or nsp12. Therefore, the generation of RdRp antibodies may provide an excellent tool to study the precise strategies of CoVs replication and transcription, as well as the role of RdRp in CoV pathogenesis.

In this study, the generation and characterization of a collection of monoclonal antibodies (mAbs) against TGEV RdRp is reported. These mAbs recognized four physically close linear epitopes at the N-terminal domain of the protein, which were conserved in genus  $\alpha$  CoVs.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Ethics statement

Animal experimental protocols were in strict accordance with EU guidelines 2010/63/UE, and Spanish national law RD 1201/2005, on the protection of animals used for experimentation and other

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 585 4555; fax: +34 91 585 4915.

E-mail addresses: [anogales@cnb.csic.es](mailto:anogales@cnb.csic.es) (A. Nogales), [galan@immunbio.mpg.de](mailto:galan@immunbio.mpg.de) (C. Galán), [smarquez@cnb.csic.es](mailto:smarquez@cnb.csic.es) (S. Márquez-Jurado), [mggallo@cnb.csic.es](mailto:mggallo@cnb.csic.es) (M. García-Gallo), [lkremer@cnb.csic.es](mailto:lkremer@cnb.csic.es) (L. Kremer), [L.Enjuanes@cnb.csic.es](mailto:L.Enjuanes@cnb.csic.es) (L. Enjuanes), [falmazan@cnb.csic.es](mailto:falmazan@cnb.csic.es) (F. Almazán).

<sup>1</sup> Present address: Department of Epigenetics, Max-Planck Institute of Immunobiology and Epigenetics, Stübeweg 51, D-79108 Freiburg, Germany.

scientific purposes, and national law 32/2007, on animal welfare in their exploitation, transport, experimentation and sacrifice. The experiments were performed at the animal facility of the Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Madrid (Permit number 28079-29-A), and were approved by the on site Ethical Review Committee (CEE-ANB).

## 2.2. Cells and virus

Swine testis (ST) cells (McClurkin and Norman, 1966) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Biowhittaker, Berviers, Belgium) at 37 °C. High Five (H5) insect cells (Invitrogen, Barcelona, Spain) were grown in TC100 medium supplemented with 10% FBS at 28 °C. TGEV PUR46-MAD strain (Sanchez et al., 1990) was used to infect ST cells as described previously (Correa et al., 1988).

## 2.3. Construction of a recombinant baculovirus expressing TGEV RdRp

A recombinant baculovirus expressing TGEV RdRp, fused to a 6-His tag at the N-terminal region (rBV-His-RdRp), was generated using the Bac-to-Bac expression system (Invitrogen, Barcelona, Spain), according to the manufacturer's instructions. A DNA fragment containing the TGEV full-length RdRp coding sequence (nts 12,309–15,094; gi:13399293), flanked by SfoI and Sall restriction sites, was generated by PCR from a TGEV-derived replicon (Almazan et al., 2004) using the forward oligonucleotide 5'-GCACTCCAAGGCGCCAGTTTACTGTTGATCAAAGTTA(C)TT(G)AA(T)CGAGTGGC(C)GG(A)TC(A)AGTGCAGCTCGACTAGAACC-3' (SfoI site is underlined) and the reverse oligonucleotide 5'-GGCTGGGTCGACTATTATTGCAAGACAGTGGACTTTTCATAGAGGC-3' (Sall site is underlined and the termination codons are in bold). The 5' end of the RdRp coding sequence contains the slippery sequence and the pseudoknot structure responsible for the –1 ribosomal frameshift that allow the expression of ORF 1b. Therefore, the forward oligonucleotide was designed to eliminate the frameshift by the introduction of 6 silent mutations in the slippery sequence and the pseudoknot (showed in parenthesis) and to restore the reading frame by insertion of a C (showed in bold) just downstream of the slippery sequence. The PCR product was digested with SfoI and Sall and cloned into the same restriction sites of the intermediate plasmid pFastBacHT (Invitrogen, Barcelona, Spain) to generate the plasmid pFB-His-RdRp, where the RdRp is fused to a His tag at the N-terminal region. This plasmid was transformed into DH10Bac cells (Invitrogen, Barcelona, Spain) to generate a recombinant bacmid by transposition of pFB-His-RdRp expression cassette. Finally, H5 insect cells were transfected with the purified recombinant bacmid using Cellfectin (Invitrogen, Barcelona, Spain) to generate the recombinant baculovirus rBV-His-RdRp. The recombinant virus was amplified in H5 cells and then high-titer virus stocks were obtained. All constructs were confirmed by sequencing.

## 2.4. Expression and purification of TGEV His-tagged RdRp

H5 cells were grown in 15-cm diameter dishes to 90% confluence and infected at a multiplicity of infection (MOI) of 2 with rBV-His-RdRp. At 60 h post-infection (hpi), infected cells were collected, washed with cold PBS and centrifuged at 1000 × g for 5 min at 4 °C. The cell pellet was resuspended in 1 ml of binding buffer (50 mM sodium-phosphate buffer, pH 8, 300 mM NaCl, 4.5 mM imidazole) per 1.5 × 10<sup>7</sup> cells, and lysed by three freeze–thaw cycles. After that, DNA was sheared by passing it 6 times through an 18-gauge needle, and the insoluble cellular material was discarded by centrifugation at 5000 × g for 15 min at 4 °C. The soluble recombinant protein was

**Table 1**  
Properties of TGEV RdRp mAbs.

mAb	Titer <sup>a</sup>	Isotype	H5 <sup>b</sup>		ST <sup>c</sup>	
			WB	IFA	WB	IFA
4D10	1:10,000	IgG1	+++	+++	+++	+
2C11	1:50,000	IgG2a	+++	+++	++	+++
3C12	1:15,000	IgG2a	+++	+++	++	++
2B5	1:3,000	IgG2a	+	++	ND	+
5H1	1:2,500	IgG2a	+	++	ND	+
3F9	1:25,000	IgG2b	+++	+++	++	+

WB, Western blot assay; IFA, immunofluorescence assay; ND, not detected.

<sup>a</sup> Antibody titer determined by ELISA.

<sup>b</sup> Insect H5 cells infected with rBV-His-RdRp.

<sup>c</sup> Porcine ST cells infected with TGEV PUR46-MAD.

purified by metal chelate affinity chromatography using Ni-NTA agarose (Sigma–Aldrich, Madrid, Spain), according to the manufacturer's instructions with some modifications. Briefly, the recombinant protein was bound to the resin by incubation at 4 °C for 2 h. Then the resin was washed 3 times with binding buffer, twice with wash buffer 1 (50 mM sodium-phosphate buffer, pH 8, 300 mM NaCl, 9 mM imidazole), and once more with wash buffer 2 (50 mM sodium-phosphate buffer, pH 8, 300 mM NaCl, 15 mM imidazole). Finally, the recombinant protein was eluted with elution buffer (50 mM sodium-phosphate buffer, pH 8, 300 mM NaCl, 150 mM imidazole), and desalted on PD-10 columns (GE Healthcare, Madrid, Spain) with PE buffer (50 mM sodium-phosphate buffer, pH 8, 100 mM NaCl). The purified protein was analyzed by SDS-PAGE and then quantified by a BCA protein assay (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) according to the manufacturer's instructions.

## 2.5. Generation of monoclonal antibodies against TGEV RdRp

Murine mAbs specific for RdRp were obtained by standard procedures (Harlow and Lane, 1988). Eight-week-old BALB/c mice were immunized subcutaneously with 30 µg of purified His-RdRp protein in complete Freund's adjuvant (Difco, Madrid, Spain), followed by similar injections in incomplete Freund's adjuvant at 4-week intervals. Ten days after the second immunization in incomplete Freund's adjuvant, serum was collected from each animal and the anti-RdRp response analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The best responder mouse was boosted intraperitoneally with 70 µg of His-RdRp in PBS and 3 days later the spleen cells were fused with the murine P3X63-Ag8.653 myeloma cell line (CRL 1580, American Type Culture Collection) using polyethylene glycol 4000 (Merck, Madrid, Spain), as described previously (Galfre and Milstein, 1981; Kremer and Márquez, 2004). The resulted hybridomas were selected for RdRp-specific antibody response by ELISA, Western blot and indirect immunofluorescence. Selected antigen-specific antibody-secreting hybrids were stabilized by limiting dilution in two cloning steps, and the immunoglobulin subclass determined by ELISA (Table 1) using specific peroxidase-conjugated antibodies against the heavy chain of mouse immunoglobulins (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 and IgM).

## 2.6. Western blot analysis

Cell lysates or purified His-RdRp protein were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-C Extra Nitrocellulose, GE Healthcare, Madrid, Spain) with a Bio-Rad Mini protean II electroblotting apparatus at 100 V for 50 min. Membranes were blocked for 1 h with 5% dried skimmed milk in TTBS (20 mM Tris–HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl, 0.1% Tween 20) and then probed with the mouse antibodies anti-polyHistidine-Peroxidase tag (Sigma–Aldrich, Madrid, Spain)

**Table 2**

Oligonucleotide used for the construction of recombinant plasmids.

Primer name <sup>a</sup>	Primer sequence 5'–3' <sup>b</sup>
Frag1VS	GCACGCTCGAGATGAGTTTACTGTGATCAAGTTACTTG
Frag1RS	GGCTGGGGATCCTAATTAATAATCAGAACCATAGATGTCAC
Frag2VS	GCACGCTCGAGATGAGTCTTAATGGCAATTTCTACGATTTCGG
Frag2RS	GGCTGGGGATCCTAATTAAGATCCCTCTTCAAAGAATCCACGC
Frag3VS	GCACGCTCGAGATGCCAGGTCACTTTAACAAGGATTCTACG
Frag3RS	GGCTGGGGATCCTAATTAATTATGTGTACAACAACCAACATGC
Frag4VS	GCACGCTCGAGATGGATAATGGTTGTTGATGGGATGGG
Frag4RS	GGCTGGGGATCCTAATTAATGCAAGACAGTGGACTTTTCATAGAGGC

<sup>a</sup> Vs, virus sense; RS, reverse sense.<sup>b</sup> Restriction endonuclease sites used for cloning are underlined (BamHI, GGATCC; XhoI, CTCGAG). Translation initiation (ATG) and termination (CTA and TTA) codons are shown in bold.

(diluted 1:20,000), the anti-RdRp mAbs generated (diluted 1:200), or the mAb 3DC10 specific for TGEV nucleocapsid (N) protein (diluted 1:2000) (Martín-Alonso et al., 1992) in TTBS containing 3% dried skimmed milk. Bound primary antibodies were detected with horseradish peroxidase conjugated rabbit anti-mouse IgG (Sigma–Aldrich, Madrid, Spain) diluted 1:30,000 in TTBS with 3% dried skimmed milk, followed by incubation with the Immobilon Western chemiluminescent substrate (Millipore Ibérica, Madrid, Spain), according to the manufacturer's recommendations.

### 2.7. Indirect immunofluorescence microscopy

Subconfluent H5 and ST cells grown on glass coverslips were mock-infected or infected at an MOI of 2 with rBV-His-RdRp and TGEV PUR46-MAD, respectively. At different hpi, cells were washed with PBS, fixed by incubation with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS for 30 min at RT, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 15 min at RT. Alternatively, cells were fixed and permeabilized with methanol for 10 min at –20 °C. After washing with PBS, cells were incubated in blocking solution (10% FBS in PBS) for 45 min at RT, incubated with the RdRp mAbs diluted 1:20 in blocking solution for 90 min at RT, washed extensively with PBS, and then incubated with alexa-488 fluorochrome-conjugated goat anti-mouse IgG (Invitrogen, Barcelona, Spain) at a 1:500 dilution in blocking solution for 1 h at RT. The coverslips were washed four times in PBS, incubated with 1 mg/ml of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 20 min at RT to stain the cell nucleus, and mounted on glass slides with Prolong Gold anti-fade reagent (Invitrogen, Barcelona, Spain). Samples were examined with a ZEISS Axiophot fluorescence microscope. Confocal microscopy was performed using a Leica SP5 laser scanning microscope, and images were collected and processed with LAS AF (Leica, Wetzlar, Germany) and Adobe Photoshop (CS3) software.

### 2.8. Plasmid construction and in vitro transcription/translation

Four overlapping DNA fragments (F1–F4) covering the full-length RdRp coding sequence (Fig. 4), flanked by XhoI and BamHI restriction sites, were generated by PCR using the plasmid pFB-His-RdRp as template and specific oligonucleotides (Table 2). Fragment F1 encodes the first 263 aa of the RdRp, F2 the region from aa 200 to 424, F3 from aa 402 to 640 and F4 from aa 606 to 929. The PCR products were digested with XhoI and BamHI and cloned into the same restriction sites of the plasmid pcDNA-3.1(–) (Invitrogen, Barcelona, Spain) under the control of the cytomegalovirus promoter to generate the plasmids pcDNA-F1, F2, F3 and F4. All constructs were confirmed by sequencing. The *in vitro* transcription/translation reactions were performed from 1 µg of each plasmid using the TNT<sup>®</sup> coupled reticulocyte lysate system (Promega Biotech Ibérica, Madrid, Spain), according to the manufacturer's instructions. Biotinylated Lys-tRNA (Promega Biotech Ibérica, Madrid, Spain) was used in translation reactions

for detection of the expressed proteins with peroxidase-conjugated streptavidin.

### 2.9. Pepscan analysis

A collection of 146 peptides of 10 aa each, overlapping in 8 residues, and covering RdRp fragment F1, was synthesized with the SPOT-synthesis method (Frank, 2002) on a ASP222 (Intavis AG, Koeln, Germany), linked to an Amino-PEG<sub>500</sub>-UC540 cellulose membrane (Intavis AG, Koeln, Germany) and probed with the RdRp mAbs by immunoblotting.

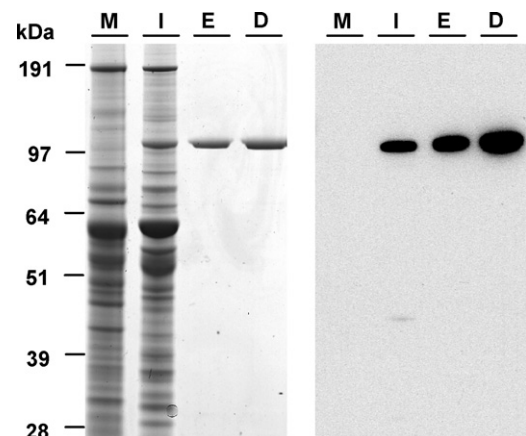
## 3. Results

### 3.1. Expression and purification of TGEV His-tagged RdRp

To generate TGEV RdRp mAbs, a recombinant baculovirus expressing the RdRp fused to a His tag on its amino terminus (rBV-His-RdRp) was generated using the Bac-to-Bac system (Invitrogen, Barcelona, Spain). H5 insect cells were infected with the recombinant virus rBV-His-RdRp. At 60 hpi, the expression of the His-tagged RdRp was analyzed by SDS-PAGE (Fig. 1, left panel) and Western blot using a polyHis specific antibody (Fig. 1, right panel). An abundant polypeptide of about 109 kDa, corresponding to the expected size of the His-RdRp fusion protein, was clearly detected in extracts from infected cells but not in mock-infected cells. The His-tagged protein was further purified under native conditions by nickel affinity chromatography, desalted using a PD10 Sephadex column, and analyzed by SDS-PAGE and Western blot. A highly pure (>95% of purity) His-RdRp protein was obtained (Fig. 1) with a concentration of 340 µg/ml.

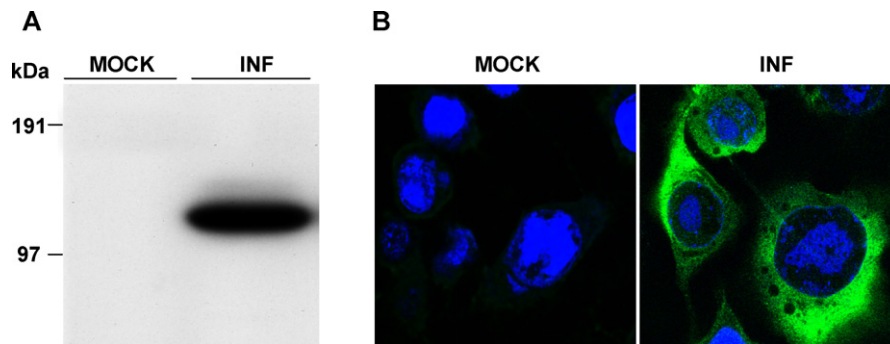
### 3.2. Production of monoclonal antibodies against TGEV RdRp

TGEV RdRp mAbs were generated in mice using the purified His-RdRp protein produced in baculovirus as immunogen. After cell fusion, the hybridomas secreting RdRp specific mAbs were identified by ELISA using the purified His-RdRp protein as the antigen. Thirty five positive hybridomas were selected and their supernatants retested by Western blot and immunofluorescence. Six out of the 35 hybridomas with the highest reactivity



**Fig. 1.** SDS-PAGE and Western blot analysis of His-RdRp expression and purification. TGEV RdRp was expressed using baculovirus as a His-tagged protein and purified by nickel affinity chromatography. Samples from the expression and purification steps were resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by coomassie blue staining (left panel) and Western blot (right panel) using a mouse anti-polyHis antibody (Sigma–Aldrich, Madrid, Spain). M, mock-infected H5 whole-cell extract; I, rBV-His-RdRp infected H5 whole-cell extract; E, fraction eluted with 150 mM imidazole; D, desalted protein. Molecular size markers are indicated in kDa.





**Fig. 2.** Characterization of RdRp mAb 4D10. Insect H5 cells were mock-infected (MOCK) or infected with rBV-His-RdRp (INF) at an MOI of 2 and analyzed at 60 hpi. (A) Western blot analysis. Cell lysates were resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with mAb 4D10. Molecular size markers are indicated in kDa. (B) Immunofluorescence analysis. Cells were fixed with PFA, permeabilized with Triton X-100, incubated with mAb 4D10 followed by Alexa-488 fluorochrome-conjugated goat anti-mouse IgG (Invitrogen, Barcelona, Spain), and analyzed by confocal microscopy. Cell nuclei were stained with DAPI.

by both techniques were cloned twice by limiting dilution and the isotype of the secreted immunoglobulin determined (Table 1). Four of them (2C11, 5H1, 3C12, and 2B5) were IgG2a, one (3F9) IgG2b, and one (4D10) IgG1. Western blot and immunofluorescence analysis demonstrated that all mAbs specifically recognized both the SDS-denatured and native recombinant protein in H5 cells infected with rBV-His-RdRp (Table 1), suggesting that the epitopes recognized by the RdRp mAbs were linear. Among these mAbs, 5H1 and 2B5 presented the lowest binding activity in both techniques, in agreement with their antibody titers that were lower than those of the other four mAbs (Table 1). As an example, the ability of mAb 4D10 to recognize the recombinant His-RdRp protein by Western blot and immunofluorescence is illustrated (Fig. 2).

### 3.3. Characterization of RdRp mAbs in TGEV infected cells

After demonstrating the specific binding of the selected mAbs to the His-RdRp protein produced in the baculovirus system, the ability of these mAbs to recognize the viral RdRp in TGEV infected ST cells was analyzed by Western blot and immunofluorescence analysis (Table 1).

Western blot of extracts from infected ST cells (12 hpi), using the mAb 4D10, demonstrated that the antibody recognized a specific band of about 105 kDa, corresponding to the viral RdRp, which was absent in mock-infected cells (Fig. 3A, left panel). In addition to the monomeric form, the antibody specifically recognized higher molecular weight polypeptides that might represent either RdRp oligomers or pp1ab polyprotein processing precursors (Fig. 3A, left panel). Similar results, with a slightly higher background, were obtained with mAbs 2C11, 3C12 and 3F9 (Fig. 3A, middle panel). In the case of mAbs 5H1 and 2B5 no binding was detected (Table 1), most likely due to the low titer of both antibodies and the low expression level of RdRp during infection, compared with the expression level of other viral proteins, such as the N protein (Fig. 3A, right panel).

Immunofluorescence analysis of infected ST cells (12 hpi) was first performed using PFA and Triton X-100 as fixation and permeabilization reagents, respectively, but only a faint perinuclear signal was detected. As an example, the staining obtained with the mAbs 4D10 and 2C11 is illustrated (Fig. 3B, upper panels). To increase the accessibility of the antigen, cells were fixed and permeabilized with methanol. Under these conditions, a specific and stronger staining was detected in infected cells with all RdRp mAbs. Among these, mAbs 2C11 and 3C12 provided the highest signal (Fig. 3B, lower panels and Table 1). The RdRp presented a perinuclear vesicular pattern that may correspond to the DMVs where viral RNA synthesis takes place (Fig. 3B).

An attempt to immunoprecipitate the RdRp in TGEV infected ST cells using the RdRp mAbs was unsuccessful, probably due to the low expression level of RdRp during the infection (data not shown).

### 3.4. Identification of the epitopes recognized by RdRp mAbs

Due to the large size of the RdRp, the epitope identification was performed in two steps. In the first step, the RdRp was subdivided into 4 overlapping fragments (F1–F4) of around 250 aa according to the predicted RdRp domains (Fig. 4A). The coding sequence of the four fragments was obtained by PCR using specific primers (Table 2). These fragments were cloned into the mammalian expression vector pcDNA-3.1(–), expressed using an *in vitro* transcription/translation system, and the binding of the mAbs to the RdRp fragments was analyzed by Western blot. All six RdRp specific mAbs recognized the fragment F1 that contains the first 263 aa of the RdRp (Fig. 4A). Interestingly, computer analysis of the RdRp sequence, using the DNASTAR software (DNASTAR Inc., Madison, USA), showed that fragment F1 had the highest surface probability and antigenic index values of the entire RdRp (data not shown). In the second step, the specific epitopes were identified by Pepscan analysis of the RdRp fragment F1. To this end, a synthetic peptide array containing 146 peptides of 10 aa each, overlapping in 8 residues, was generated using the SPOT-synthesis method (Frank, 2002) and probed with the RdRp mAbs by immunoblotting. Four linear epitopes located in a 62 aa region from residues 97–158 were identified (Fig. 4B). The epitope sequences were 97-DFFTYK-102 for 2C11 and 3C12, 117-TKYTMM-122 for 4D10, 125-CYAIRN-130 for 5H1, and 153-FFENKD-158 for 3F9 and 2B5. These data suggest that the RdRp N-terminal region covering residues 97 to 158 may constitute an immunodominant domain.

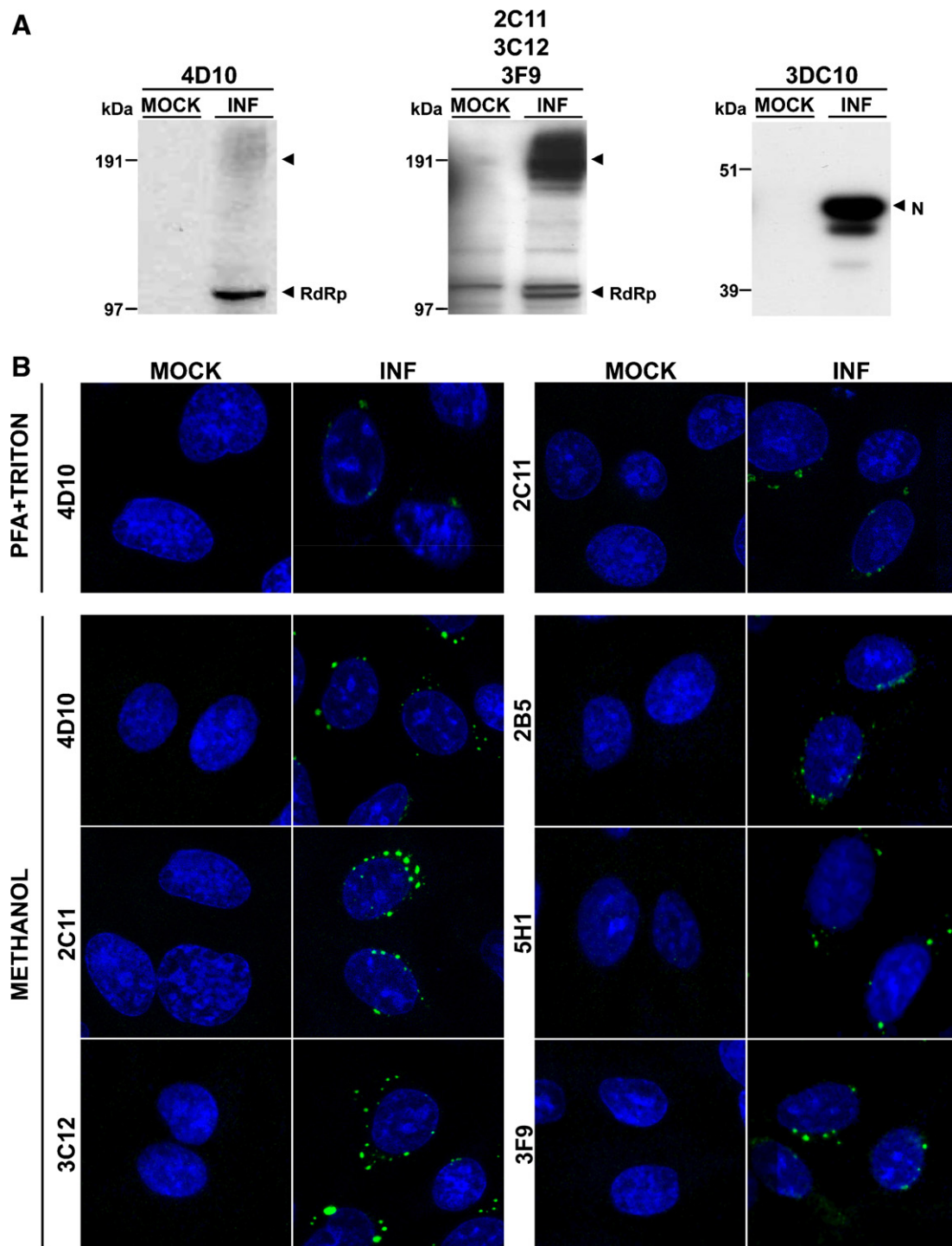
## 4. Discussion

After the SARS outbreak in 2002 (Drosten et al., 2003), the study of CoV replication has acquired significant relevance in order to develop effective strategies to prevent and control CoV infections. The RdRp is a key protein involved in both genome replication and transcription. Therefore, the availability of RdRp mAbs will significantly facilitate the study of CoV replication and transcription mechanisms.

In this study, a set of six mAbs against the TGEV RdRp was generated and characterized. Most of mAbs recognized both the recombinant His-RdRp protein expressed in insect cells and the viral protein in TGEV infected ST cells, by both Western blot and immunofluorescence analysis (Table 1).

Analysis of infected ST cells by Western blot showed a specific band of 105 kDa. Additionally, higher molecular mass polypeptides



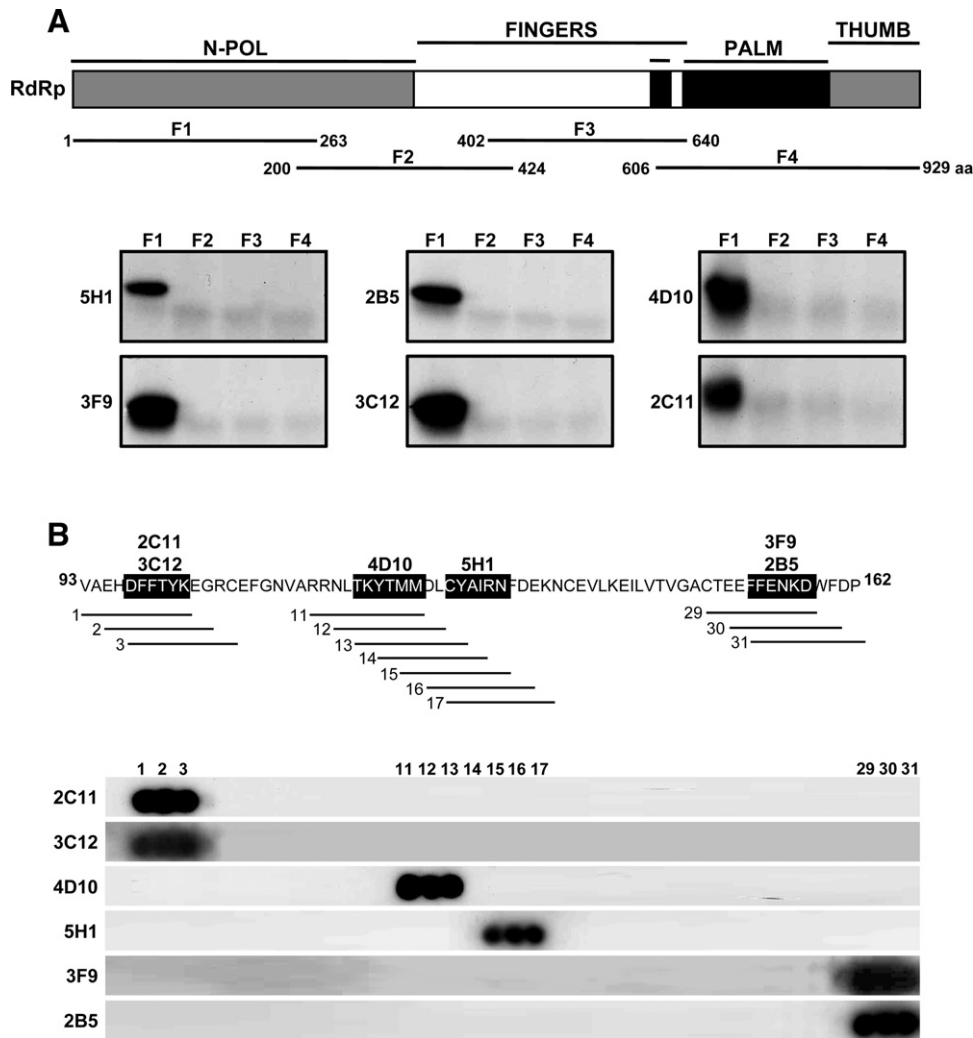


**Fig. 3.** Identification of RdRp in TGEV infected ST cells. Porcine ST cells were mock-infected (MOCK) or infected (INF) with TGEV at an MOI of 2 and RdRp expression analyzed at 12 hpi. (A) Western blot analysis. Total cell extracts were resolved by 4–12% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with the indicated RdRp mAbs (left and middle panels) and the N protein mAb 3DC10 as a control of TGEV infection (right panel). Specific bands are indicated by arrowheads. Molecular size markers are shown in kDa. (B) Immunofluorescence analysis. Cells were fixed and permeabilized with PFA and Triton X-100 or with methanol, incubated with the indicated RdRp mAbs followed by Alexa-488 fluorochrome-conjugated goat anti-mouse IgG (Invitrogen, Barcelona, Spain), and analyzed by confocal microscopy. Cell nuclei were stained with DAPI.

of around 150 kDa were also detected, which could represent RdRp homo- or hetero-oligomeric structures or pp1ab polyprotein processing precursors. Similar results have been reported in MHV, where RdRp protein precursors of about 150 and 300 kDa were detected (Brockway et al., 2003). RdRp was also recognized by immunofluorescence, showing a perinuclear vesicular pattern that is typical for CoV DMVs, where viral RNA synthesis takes place

(Gosert et al., 2002; Knoops et al., 2008; Snijder et al., 2006). From these results, it could be concluded that RdRp mAbs recognize both the unfolded and the native protein and most likely they recognize linear epitopes.

The epitopes recognized by the RdRp mAbs were identified by Pepscan analysis. Four different linear epitopes were found in a 62 aa region at the RdRp N-terminal domain, indicating that



**Fig. 4.** Epitope mapping of RdRp mAbs. (A) Identification of RdRp domains recognized by the mAbs. Four overlapping fragments (F1–F4) covering the full-length RdRp were obtained by PCR, expressed in a transcription/translation system, and probed with the RdRp mAbs by Western blot. The RdRp domains (N-pol, Fingers, Palm and Thumb) and the location of the 4 fragments within the RdRp sequence are shown in the upper part of the figure. (B) Pepscan analysis of RdRp fragment F1. A synthetic peptide array, covering fragment F1, was generated as described in Section 2 and probed with the RdRp mAbs by immunoblotting. The position in the array and the sequence of the peptides recognized by the mAbs are indicated. The deduced epitope sequence for each mAb is shown in black boxes.

this region constitutes an immunodominant domain. These epitopes are conserved among TGEV related members of the CoV genus  $\alpha$ , such as the canine and feline CoVs (CCoV and FCoV) (Fig. 5). Interestingly, the epitope recognized by the mAb 4D10 is highly conserved in the majority of CoVs from genus  $\alpha$ , in

infectious bronchitis virus (IBV) from genus  $\gamma$ , and in SARS-CoV from genus  $\beta$  (Fig. 5). In fact, the mAb 4D10 recognized the SARS-CoV RdRp by Western blot (data not shown), indicating that this mAb, at least, may be used to identify the RdRp of other CoVs.



**Fig. 5.** Conservation of TGEV RdRp epitopes in other CoVs. The RdRp region covering residues 93–162 of CoVs from the three genera ( $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ ) were aligned using the Clustal-W program. The sequence of the TGEV RdRp epitopes and the residues conserved in other CoVs are boxed. TGEV, transmissible gastroenteritis PUR46-MAD (gi:13399293); HCoV229E, human CoV 229E (gi:12175747); NL63, human CoV NL63 (gi:93004453); CCoV, canine CoV (gi:214027098); FCoV, feline CoV (gi:302877212); PEDV, porcine epidemic diarrhea virus (gi:121722566); BtCoV-512, bat CoV 512 (gi:152994037); MHV, mouse hepatitis virus (gi:6625761); SARS-CoV, severe acute respiratory syndrome virus (gi:30027617); IBV, infectious bronchitis virus (gi:33569220).

Although polyclonal antibodies recognizing the RdRp of genus  $\beta$ -belonging SARS-CoV and mouse hepatitis virus (MHV) have been described previously (Prentice et al., 2004; Shi et al., 1999), this is the first time that mAbs recognizing the RdRp from CoVs of genus  $\alpha$  have been generated and their epitopes identified. The availability of these mAbs will be very useful to study the CoV replication and transcription mechanisms.

## Acknowledgments

We thank F. Roncal for advice and assistance in the Pepscan analysis and M. Llorente and L. Martín for help in mAbs generation. We also thank S. Zúñiga and I. Sola for critically reading the manuscript. This work was supported by grants from the Ministry of Science and Innovation of Spain (MCINN) (BIO2010-16705), the Spanish National Research Council (CSIC) (projects 2009201024, 2009201016 and 201120E007), the Community of Madrid (S-SAL-0185-2006), the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under the projects "PLAPROVA" (KBBE-227056) and "EMPERIE" (223498), and Pfizer Animal Health. AN and SM received a predoctoral fellowship from MCINN and from National Institute of Health (ISCIII) of Spain, respectively. CG and MG received a contract from the Spanish National Research Council (CSIC).

## References

- Almazan, F., Galan, C., Enjuanes, L., 2004. The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J. Virol.* 78, 12683–12688.
- Brierley, I., Boursnell, M.E., Binns, M.M., Bilimoria, B., Blok, V.C., Brown, T.D., Inglis, S.C., 1987. An efficient ribosomal frame-shifting signal in the polymerase-encoding region of the coronavirus IBV. *EMBO J.* 6, 3779–3785.
- Brierley, I., Digard, P., Inglis, S.C., 1989. Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot. *Cell* 57, 537–547.
- Brockway, S.M., Clay, C.T., Lu, X.T., Denison, M.R., 2003. Characterization of the expression, intracellular localization, and replication complex association of the putative mouse hepatitis virus RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.* 77, 10515–10527.
- Correa, I., Jiménez, G., Suñé, C., Bullido, M.J., Enjuanes, L., 1988. Antigenic structure of the E2 glycoprotein from transmissible gastroenteritis coronavirus. *Virus Res.* 10, 77–94.
- de Groot, R.J., Ziebuhr, J., Poon, L.L., Woo, P.C., Talbot, P., Rottier, P.J.M., Holmes, K.V., Baric, R., Perlman, S., Enjuanes, L., Gorbalenya, A.E., 2010. Taxonomic structure of the Coronaviridae. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberg, U., King, A. (Eds.), *Virus Taxonomy*. International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press.
- Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R.A., Berger, A., Burguiere, A.M., Cinatl, J., Eickmann, M., Esciou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J.C., Müller, S., Rickerts, V., Stürmer, M., Vieth, S., Klenk, H.D., Osterhaus, A.D., Schmitz, H., Doerr, H.W., 2003. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348, 1967–1976.
- Enjuanes, L., Almazan, F., Sola, I., Zuniga, S., 2006. Biochemical aspects of coronavirus replication and virus–host interaction. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 211–230.
- Enjuanes, L., Gorbalenya, A.E., de Groot, R.J., Cowley, J.A., Ziebuhr, J., Snijder, E.J., 2008. The Nidovirales. In: Mahy, B.W.J., Van Regenmortel, M., Walker, P., Majumder-Russell, D. (Eds.), *Encyclopedia of Virology*, third ed. Elsevier Ltd., Oxford, pp. 419–430.
- Frank, R., 2002. The SPOT-synthesis technique. *Synthetic peptide arrays on membrane supports—principles and applications*. *J. Immunol. Methods* 267, 13–26.
- Galan, C., Sola, I., Nogales, A., Thomas, B., Akoulitchiev, A., Enjuanes, L., Almazan, F., 2009. Host cell proteins interacting with the 3' end of TGEV coronavirus genome influence virus replication. *Virology* 391, 304–314.
- Galfre, G., Milstein, C., 1981. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. In: Langone, J.J., Van Vunakis, H. (Eds.), *Immunochemical Techniques*. Academic Press, New York, pp. 3–46.
- Gosert, R., Kanjanahaluethai, A., Egger, D., Bienz, K., Baker, S.C., 2002. RNA replication of mouse hepatitis virus takes place at double-membrane vesicles. *J. Virol.* 76, 3697–3708.
- Harlow, E., Lane, D., 1988. *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Knoops, K., Kikkert, M., Worm, S.H., Zevenhoven-Dobbe, J.C., van der Meer, Y., Koster, A.J., Mommaas, A.M., Snijder, E.J., 2008. SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol.* 6, e226.
- Kremer, L., Márquez, G., 2004. Generation of monoclonal antibodies against chemokine receptors. In: D'Ambrosio, D., Sinigaglia, F. (Eds.), *Methods in Molecular Biology*, vol. 239. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 243–260.
- Martin-Alonso, J.M., Balbín, M., Garwes, D.J., Enjuanes, L., Gascón, S., Parra, F., 1992. Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus nucleoprotein. *Virology* 188, 168–174.
- Masters, P.S., 2006. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 66, 193–292.
- McClurkin, A.W., Norman, J.O., 1966. Studies on transmissible gastroenteritis of swine. II. Selected characteristics of a cytopathogenic virus common to five isolates from transmissible gastroenteritis. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 30, 190–198.
- Perlman, S., Lane, T.E., Buchmeier, M.J., 2000. Coronavirus: hepatitis, peritonitis, and central nervous system disease. In: Cunningham, M.W., Fujinami, R.S. (Eds.), *Effects of Microbes on the Immune System*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 331–348.
- Prentice, E., McAuliffe, J., Lu, X., Subbarao, K., Denison, M.R., 2004. Identification and characterization of severe acute respiratory syndrome coronavirus relicase proteins. *J. Virol.* 78, 9977–9986.
- Sanchez, C.M., Jiménez, G., Laviada, M.D., Correa, I., Suñé, C., Bullido, M.J., Gebauer, F., Smerdou, C., Callebaut, P., Escribano, J.M., Enjuanes, L., 1990. Antigenic homology among coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus. *Virology* 174, 410–417.
- Shi, S.T., Schiller, J.J., Kanjanahaluethai, A., Baker, S.C., Oh, J.W., Lai, M.M.C., 1999. Colocalization and membrane association of murine hepatitis virus gene 1 products and de novo-synthesized viral RNA in infected cells. *J. Virol.* 73, 5957–5969.
- Snijder, E.J., van der Meer, Y., Zevenhoven-Dobbe, J., Onderwater, J.J., van der Meulen, J., Koerten, H.K., Mommaas, A.M., 2006. Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex. *J. Virol.* 80, 5927–5940.
- Ziebuhr, J., 2005. The coronavirus replicase. In: Enjuanes, L. (Ed.), *Coronavirus Replication and Reverse Genetics*. Springer, pp. 57–94.
- Ziebuhr, J., Snijder, E.J., Gorbalenya, A.E., 2000. Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J. Gen. Virol.* 81, 853–879.
- Zuñiga, S., Sola, I., Alonso, S., Enjuanes, L., 2004. Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis. *J. Virol.* 78, 980–994.

## Transmissible Gastroenteritis Coronavirus RNA-Dependent RNA Polymerase and Nonstructural Proteins 2, 3, and 8 Are Incorporated into Viral Particles

Aitor Nogales, Silvia Márquez-Jurado, Carmen Galán, Luis  
Enjuanes and Fernando Almazán

*J. Virol.* 2012, 86(2):1261. DOI: 10.1128/JVI.06428-11.

Published Ahead of Print 16 November 2011.

---

Updated information and services can be found at:  
<http://jvi.asm.org/content/86/2/1261>

---

### REFERENCES

*These include:*

This article cites 26 articles, 13 of which can be accessed free  
at: <http://jvi.asm.org/content/86/2/1261#ref-list-1>

### CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new  
articles cite this article), [more»](#)

---

---

Information about commercial reprint orders: <http://jvi.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>  
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

---



# Transmissible Gastroenteritis Coronavirus RNA-Dependent RNA Polymerase and Nonstructural Proteins 2, 3, and 8 Are Incorporated into Viral Particles

Aitor Nogales, Silvia Márquez-Jurado, Carmen Galán,\* Luis Enjuanes, and Fernando Almazán

Department of Molecular and Cell Biology, Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Campus Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid, Spain

**Coronavirus replication and transcription are processes mediated by a protein complex, with the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) as a main component. Proteomic analysis of highly purified transmissible gastroenteritis virus showed the RdRp to be a component of the viral particles. This finding was confirmed by Western blotting, immunofluorescence, and immunoelectron microscopy analyses. Interestingly, the replicase nonstructural proteins 2, 3, and 8 colocalized with the RdRp in the viral factories and were also incorporated into the virions.**

Transmissible gastroenteritis virus (TGEV) is an enveloped virus with a 28.6-kb positive-stranded RNA genome that belongs to the genus  $\alpha$  of the *Coronaviridae* family within the *Nidovirales* order (4, 6) (see <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> for official coronavirus taxonomy). Coronavirus (CoV) replication and transcription are complex processes that take place at cytoplasmic double-membrane vesicles (DMVs) and involve coordinated processes of both continuous and discontinuous RNA synthesis (8, 11, 13, 16, 24). Both processes are mediated by a protein complex encoded by the replicase gene together with the participation of cellular factors (7, 25, 26). The replicase gene, which occupies the 5' two-thirds of the genome, is translated at the beginning of the infection into two co-amino-terminal polyproteins. Both proteins are autoproteolytically cleaved into 16 nonstructural proteins (nsp1 to nsp16), including two proteinases (nsp3 and nsp5), the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp, or nsp12), the RNA helicase (nsp13), and a primase (nsp8), which are believed to be part of the replication-transcription complex (10, 26, 27). In addition to the replicase proteins, the viral nucleoprotein (N) has also been described to play an important role in CoV RNA synthesis (1, 23, 28). In contrast to negative-strand RNA viruses, it is currently accepted that in positive-strand RNA viruses, the replicase proteins are not incorporated into viral particles. However, a recent study based on a proteomic analysis of purified severe acute respiratory syndrome CoV (SARS-CoV) showed the presence of nsps 2, 3, and 5 in the virions (17).

In the present study, we report the presence of RdRp, nsp2, nsp3, and nsp8 in highly purified TGEV particles by Western blotting, immunofluorescence, and immunoelectron microscopy assays.

**Analysis of the RdRp presence in TGEV viral particles.** To analyze the presence of RdRp in viral particles, highly purified TGEV (PUR46-MAD strain) was prepared as described previously (5). Briefly, the virus from clarified infected cell culture supernatants was concentrated by centrifugation through a 31% sucrose cushion and then purified over a continuous 30% to 42% sucrose density gradient. The purity and integrity of the purified virus were confirmed by conventional electron microscopy. More than 99% of the viral particles preserved their structural properties, and no vesicles or other contaminants were detected (Fig. 1A). The protein profile of the purified virus was then analyzed by

SDS-PAGE, and in addition to the structural proteins S, N, and M, a large number of proteins with different molecular masses were also detected (Fig. 1B). These proteins were excised from the gel, digested with trypsin, and analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in an ABI 4800 MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Applied Biosystem), as described previously (9). Most of the identified proteins were cellular proteins, including membrane alanine aminopeptidase, eukaryotic translation elongation factor 2, the heat shock 90-kDa AB1 protein, calnexin, the poly(A) binding protein, the chaperonin containing TCP1 (subunit 7), F1 ATP synthase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, tubulin ( $\beta$ 5), and  $\beta$ -actin. All of these proteins were identified with significant Mascot scores ( $P < 0.05$ ) and sequence coverage between 45% and 87%. With the exception of the membrane alanine aminopeptidase, these proteins have been previously identified either in purified SARS-CoV (17) or infectious bronchitis virus (14). Interestingly, a minor polypeptide with apparent mass of 105 kDa was identified as the viral RdRp (Fig. 1B), suggesting that the RdRp was incorporated into the viral particles. However, other replicase proteins were not detected in this analysis.

To confirm the RdRp encapsidation, its presence in purified virions was initially analyzed by Western blotting. To this end, 10  $\mu$ g of purified TGEV and extracts from porcine swine testis (ST) cells either mock infected or infected with TGEV at a multiplicity of infection (MOI) of 5 for 12 h were resolved by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting using the RdRp monoclonal antibody (MAb) 4D10 (diluted 1:100), as described previously (18). The blots were also probed with the MAb 5BH1 (diluted 1:4,000) (12) specific for TGEV S protein as a positive control and a rabbit polyclonal antibody (pAb) against the endoplasmic reticulum

Received 28 September 2011 Accepted 3 November 2011

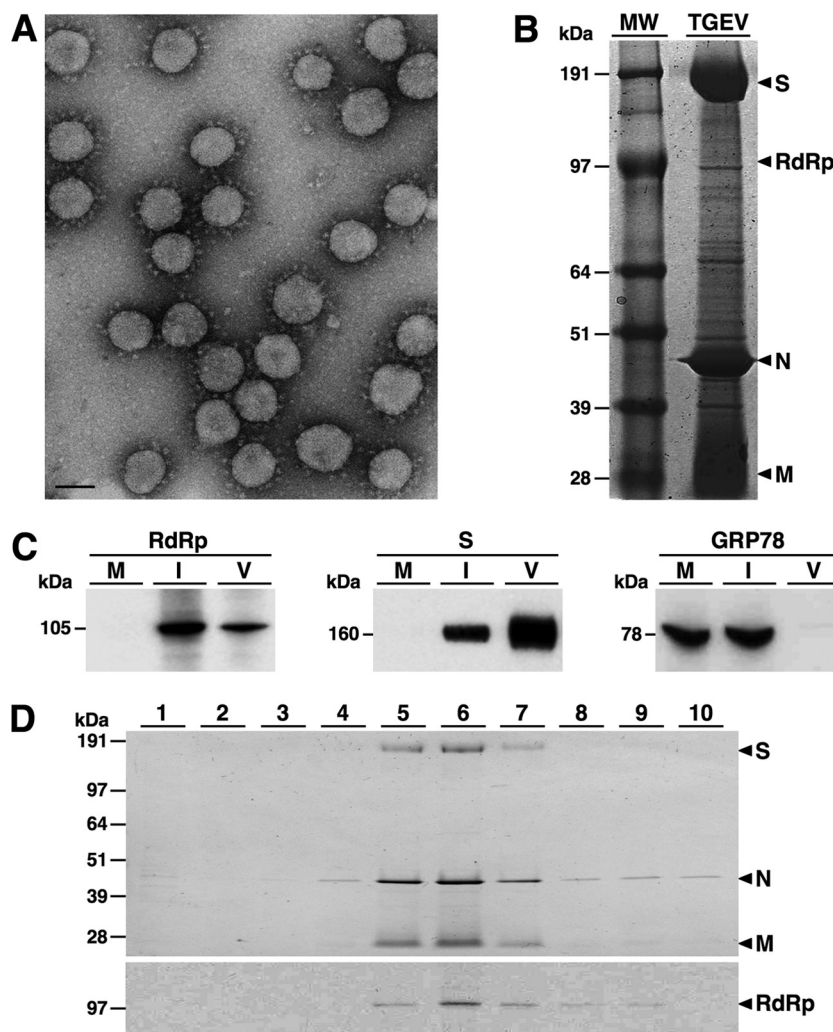
Published ahead of print 16 November 2011

Address correspondence to L. Enjuanes, L.Enjuanes@cnb.csic.es.

\* Present address: Department of Epigenetics, Max-Planck Institute of Immunobiology and Epigenetics, Freiburg, Germany.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JVI.06428-11



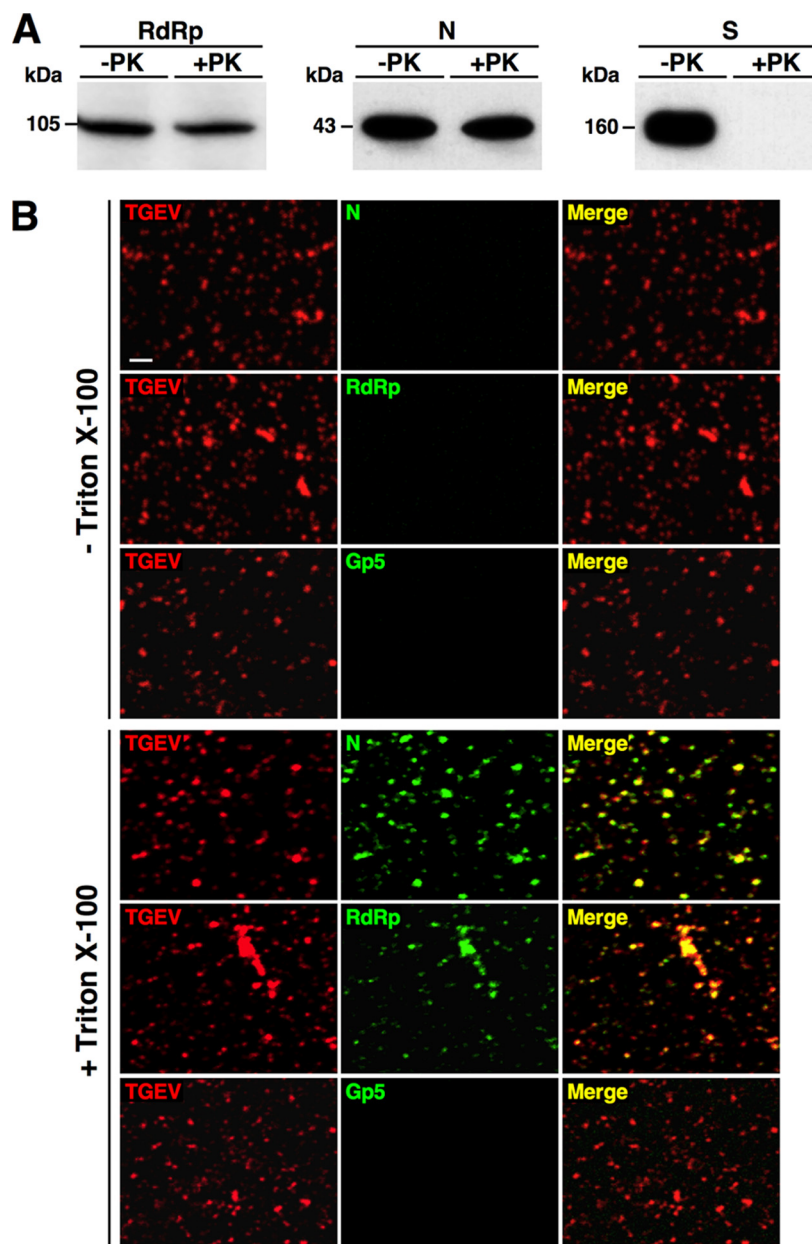
**FIG 1** Identification of RdRp in purified TGEV. (A) Electron microscopy of purified TGEV. Purified virus was adsorbed to glow-discharged carbon-coated copper grids, processed for negative staining with 2% uranyl acetate as described previously (2), and examined in a JEOL JEM-1020 transmission electron microscope. Bar, 100 nm. (B) Proteomic analysis of purified TGEV. Proteins from 30  $\mu$ g of purified TGEV were separated by SDS-PAGE (4 to 12%), stained with Coomassie blue, excised from the gel, and analyzed by mass spectrometry. Arrowheads indicate the identified viral proteins. Molecular mass markers are shown in kDa. (C) Western blot of purified TGEV virions. Proteins from 10  $\mu$ g of purified TGEV (V) were separated by SDS-PAGE (4 to 12%) together with extract from ST cells mock infected (M) or infected with TGEV (I) and analyzed by immunoblotting with specific antibodies recognizing RdRp, S, and GRP78 (Abcam). Protein molecular masses in kDa are shown to the left. (D) Analysis of RdRp during the virus purification process. Fractions from the sucrose density gradient were collected from the bottom to the top, resolved by SDS-PAGE (4 to 12%), and analyzed by Coomassie blue staining (upper panel) or immunoblotting using the RdRp MAb 4D10 (lower panel). The viral proteins S, N, M, and RdRp are indicated by arrowheads. Molecular mass markers are shown in kDa.

marker GRP78 (Abcam) (diluted 1:4,000) as a negative control. Bound antibodies were detected with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit IgG (Sigma) diluted 1:30,000 and the Immobilon Western chemiluminescent substrate (Millipore), according to the manufacturer's recommendations. Similarly to the S protein, the RdRp was detected in infected cells and purified virus, while the GRP78 was detected in mock-infected and infected cells but not in purified virus (Fig. 1C). To discard that the RdRp was a general contaminant of the virus purification process, its presence in the different fractions of the sucrose gradient was analyzed by Western blotting. The RdRp was only detected in the fractions containing the virus (Fig. 1D), indicating that the RdRp copurified with the viral particles.

To further investigate whether the RdRp was in fact incorporated into the viral particles, the purified virus was treated with

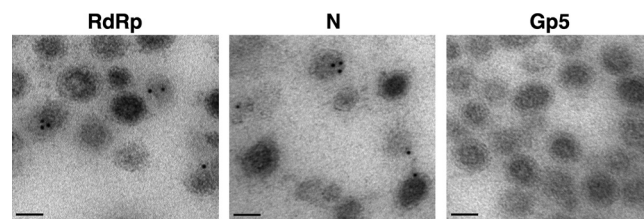
proteinase K and analyzed by Western blotting (Fig. 2A). Protease treatment would degrade proteins outside the virus particle or exposed on the virus surface, such as S protein, while proteins inside the virions, such as N protein, must be protected by the lipid envelope. Purified virus was either not treated or treated with 0.01  $\mu$ g of proteinase K (Roche) per  $\mu$ g of virus at 25°C for 30 min and analyzed by immunoblotting using the RdRp MAb 4D10 (diluted 1:100) (18), the S MAb 5BH1 (diluted 1:4,000) (12), and the N MAb 3DC10 (diluted 1:3,000) (15) as described above. Similarly to the N protein, more than 75% of the RdRp present in the purified virus was detected after proteinase K treatment, while the S protein was completely degraded (Fig. 2A), indicating that the RdRp was inside the virions.

To provide additional evidence of the RdRp encapsidation, purified TGEV was analyzed by immunofluorescence before and



**FIG 2** Identification of RdRp in TGEV particles. (A) Analysis of RdRp in viral particles treated with proteinase K. Ten micrograms of highly purified TGEV was not treated (–PK) or treated (+PK) with 0.1  $\mu$ g of proteinase K, and the presence of the viral proteins RdRp, N, and S was analyzed by Western blotting using specific MAbs. Protein molecular masses in kDa are shown to the left. (B) Identification of RdRp in purified virions by immunofluorescence analysis. Virions on glass coverslips were fixed, not permeabilized or permeabilized with Triton X-100, and analyzed by immunofluorescence using specific antibodies against TGEV (red), RdRp (green), N (green), and PRRSV GP5 (green). Colocalization is indicated by yellow pixels in the merge panels. Bar, 2  $\mu$ m.

after permeabilization with Triton X-100 (Fig. 2B). Purified TGEV virions were placed on glass coverslips previously treated with 0.1 mg/ml poly-L-lysine (Sigma), fixed by incubation with 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS) buffer for 45 min at room temperature, and either not permeabilized or permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 20 min at room temperature. After incubating for 1 h in blocking solution (10% fetal bovine serum [FBS] in PBS), the viral particles were incubated with RdRp MAb 2C11 (diluted 1:20 in blocking solution) for 90 min at room temperature. Among the previously described RdRp MAbs, this antibody was chosen because it provides



**FIG 3** Analysis of RdRp in purified TGEV virions by immunoelectron microscopy. Ultrathin sections of purified virions were immunogold labeled with specific antibodies recognizing TGEV RdRp and N proteins or an irrelevant antibody against PRRSV GP5, followed by 5-nm-diameter gold-conjugated rabbit anti-mouse IgG. Bars, 50 nm.



TABLE 1 Gold particle distribution in purified TGEV virions

Gold labeling location	No. (%) of gold particles in:				
	–C <sup>a</sup>	RdRp	Nsp2	Nsp3	N
Inside	0	264 (65.2)	252 (63.6)	232 (59.5)	260 (61.3)
Edge	0	54 (13.3)	48 (12.2)	68 (17.4)	48 (11.3)
Outside	32 (100)	87 (21.5)	96 (24.2)	90 (23.1)	116 (27.4)
Total	32 (100)	405 (100)	396 (100)	390 (100)	424 (100)

<sup>a</sup> –C, negative control (irrelevant antibody).

the highest signal in immunofluorescence (18). Alternatively, virions were probed with a rabbit pAb against TGEV (20) (diluted 1:1,200) as a control for virus identity, the N MAb 3DC10 (15) (diluted 1:100) as a control for an internal protein, and an irrelevant MAb recognizing the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) GP5 envelope protein (22) (diluted 1:100) as a negative control. After washing with PBS, the samples

were incubated for 1 h at room temperature with secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488 or 549 (Invitrogen) diluted 1:500 in blocking solution, mounted on glass slides with Prolong Gold anti-fade reagent (Invitrogen), and analyzed with a Leica SP5 laser scanning microscope. Intact virions were labeled with only the TGEV pAb, which recognized the N, S, and M proteins (Fig. 2B, left panels). In contrast, when TGEV particles were permeabilized, a clear labeling was observed both with the N or RdRp MABs, which colocalized with the viral particles detected with the TGEV pAb (Fig. 2B, right panels). As expected, no labeling was observed with the PRRSV GP5 antibody in both permeabilized and nonpermeabilized samples (Fig. 2B). These data indicated that similarly to the N protein, RdRp was incorporated into the viral particles.

The presence of the RdRp in the virions was further analyzed by immunoelectron microscopy. Purified TGEV virions were fixed with a mixture of 4% PFA and 0.1% glutaraldehyde in PBS for 30 min at 4°C, cryoprotected with 30% glycerol, and quickly frozen in liquid ethane at –180°C. Then, vitrified samples were

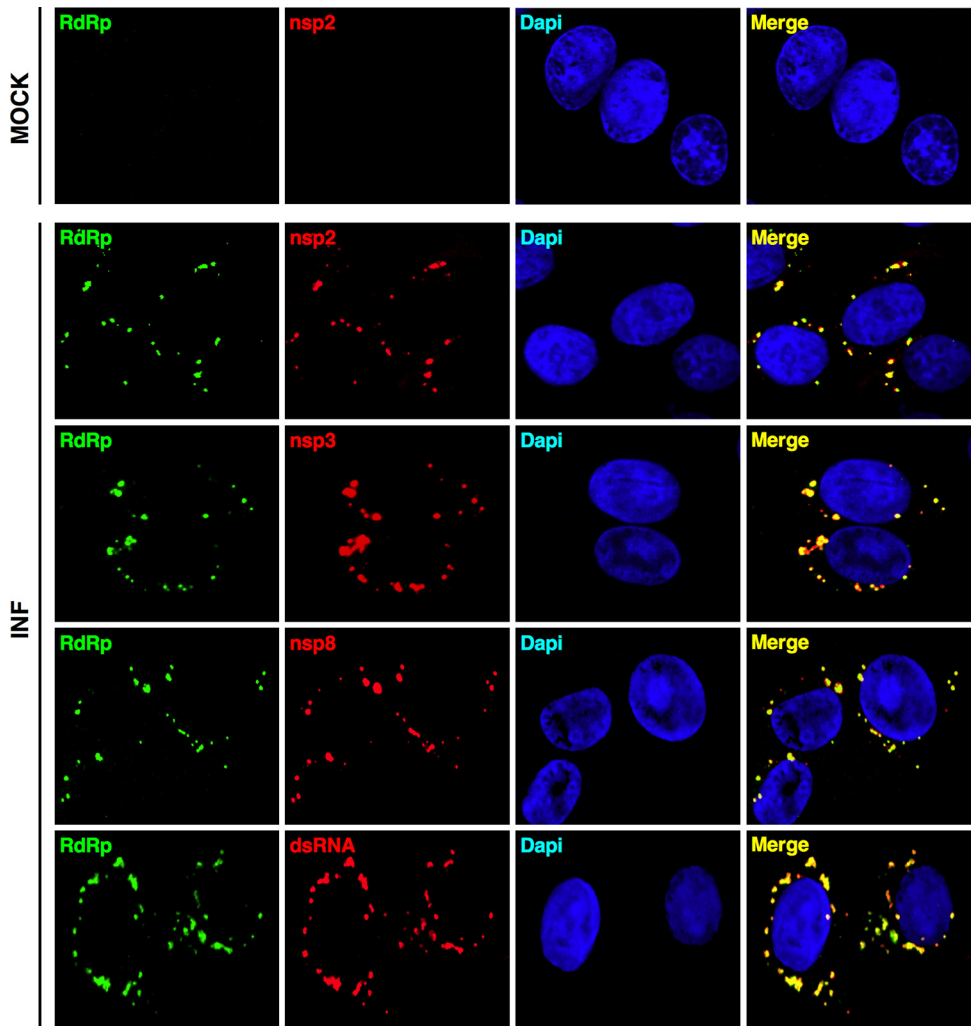
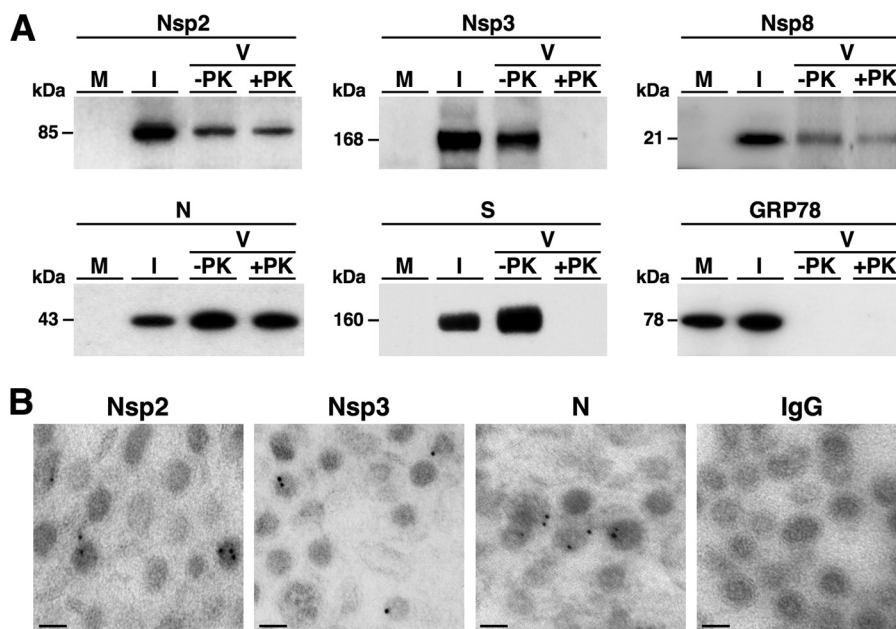


FIG 4 Colocalization analysis of RdRp with nsp2, nsp3, nsp8, and dsRNA. Confocal immunofluorescence analysis was performed on ST cells mock infected (MOCK) or infected (INF) with TGEV (MOI, 2) for 9 h. RdRp (green) was detected with either MAb 2C11 or a rabbit pAb (bottom left panel). Nsps 2, 3, and 8 (red) were visualized with specific rabbit pAbs and dsRNA (red) with a commercial MAb (English & Scientific Consulting). Cell nuclei (blue) were stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Colocalization is indicated by yellow pixels in the merge panels. In mock-infected cells, the staining with the RdRp and nsp2 antibodies is shown as a representative example of the labeling with the other antibodies.





**FIG 5** Identification of nsps 2, 3, and 8 in TGEV viral particles. (A) Western blot analysis. Proteins from purified TGEV (V) treated (+PK) or not treated (–PK) with proteinase K were separated by SDS-PAGE (4 to 12%) together with extracts from ST cells mock infected (M) or infected (I) with TGEV and analyzed by immunoblotting with specific antibodies recognizing nsp2, nsp3, nsp8, S, N, and GRP78. Protein molecular masses in kDa are shown to the left. (B) Immunoelectron microscopy analysis. Ultrathin sections of purified virions were immunogold labeled with specific antibodies recognizing the indicated proteins or with mouse and rabbit irrelevant antibodies (IgG), followed by 5-nm-diameter gold-conjugated secondary antibodies. Bars, 50 nm.

transferred to a Leica AFS2 EM FSP freeze-substitution unit and embedded in Lowicryl HM20 (TAAB) as described previously (19). Ultrathin sections (90 nm) on gold grids were immunogold labeled with purified RdRp MAb 2C11 (2 mg/ml) diluted 1:50 and a 5-nm-diameter colloidal gold-conjugated rabbit anti-mouse IgG (BBI) diluted 1:40, as described previously (21). Immunogold labeling was also performed with the PRRSV GP5 and TGEV N 3DC10 MAbs diluted 1:5 (15, 22) as negative and positive controls, respectively. Finally, the samples were negative stained with 2% uranyl acetate for 20 min at room temperature and examined in a JEOL JEM-1020 transmission electron microscope. Virions with gold particles were detected in the samples probed with the RdRp and N MAbs but not in that probed with the PRRSV GP5 MAb (Fig. 3). Interestingly, the proportion of virions labeled with the RdRp MAb (328 labeled viruses out of 3,645 counted viruses [9%]) was very similar to that observed with the N MAb (369 labeled viruses out of 3,720 counted viruses [10%]), and it was consistent with the expected proportion of virions that are accessible to the antibodies in one section of 90 nm (the viral particle size). In addition, a careful examination of the gold particle distribution in the virions labeled either with the RdRp or N MAbs indicated that the majority (about 65%) were located inside the viral particles (Table 1). All together, these data confirmed that the RdRp was incorporated into the viral particles.

**Analysis of the presence of nsps 2, 3, and 8 in TGEV viral particles.** Taken into consideration that RdRp is a main component of the replication-transcription complex, the encapsidation of other replicase proteins potentially involved in CoV RNA synthesis was also analyzed. Based on the availability of pAbs recognizing the TGEV nsps 2, 3, and 8, these replicase proteins were selected for this study. The nsp3 antibody was generated in rabbit using the His-tagged N-terminal 345-amino-acid (aa) fragment expressed in *Escherichia*

*coli* as immunogen (data not shown). This fragment contains the acidic and most of the PLP1 protease domains. The pAbs recognizing TGEV nsp2 and nsp8 were kindly provided by John Ziebuhr (Justus Liebig University, Giessen, Germany).

Before studying the incorporation of nsps 2, 3, and 8 into the viral particles, their presence in TGEV replication-transcription factories was analyzed by confocal immunomicroscopy. To this end, subconfluent ST cells grown on glass coverslips were mock infected or infected with TGEV at an MOI of 2. At 9 h postinfection, cells were fixed and permeabilized with methanol for 10 min at  $-20^{\circ}\text{C}$  and analyzed by confocal immunomicroscopy using the RdRp MAb 2C11 (diluted 1:20) and the pAbs against nsps 2, 3, and 8 (diluted 1:300), as described above. In infected cells, a clear colocalization of RdRp with nsps 2, 3, and 8 was observed in cytoplasmic perinuclear structures that might correspond to the DMVs (3, 11, 13) (Fig. 4). In addition, when the subcellular distribution of RdRp and double-stranded RNA (dsRNA; a marker of active viral RNA synthesis) was analyzed using a MAb specific for dsRNA (English & Scientific Consulting) and a pAb against the TGEV RdRp (generated in rabbit using the RdRp expressed in baculovirus), a clear colocalization was also found (Fig. 4). In contrast, in mock-infected cells, no labeling was detected with any antibody for the nsps and dsRNA, as expected (Fig. 4, upper panels). These results indicated that nsps 2, 3, and 8 together with RdRp were accumulated in the replication-transcription complexes responsible for viral RNA synthesis.

The presence of nsps 2, 3, and 8 in the viral particles was first analyzed by Western blotting as described above. Extracts from ST cells either mock infected or infected with TGEV (MOI of 5 for 12 h) and 10  $\mu\text{g}$  of purified TGEV either treated or not treated with proteinase K were resolved by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with the pAbs specific for nsps 2 (diluted 1:4,000), 3

(diluted 1:8,000), and 8 (diluted 1:2,000). As controls, the blots were also probed with the S MAb 5BH1 (diluted 1:4,000) (12), the N MAb 3DC10 (diluted 1:3,000) (15), and the GRP78 pAb (diluted 1:4,000) (Abcam). Similarly to N and S proteins, and in contrast to GRP78, nsps 2, 3, and 8 were detected in purified virus (Fig. 5A). After treatment with proteinase K, the levels of nsp2, nsp8 and N were not significantly reduced, while nsp3 and S were not detected at all (Fig. 5A). These data suggested that nsps 2 and 8 were incorporated into the viral particles and nsp3 was either a contaminant of the purification process or an envelope protein such as the S protein. To provide additional evidence of the encapsidation of these nsps, their presence in purified virions was analyzed by immunoelectron microscopy using the specific pAbs diluted 1:25, following the same procedure described above for the RdRp. The same experiment was performed with irrelevant antibodies and the N MAb 3DC10 (15) diluted 1:5 as negative and positive controls, respectively. Unfortunately the nsp8 pAb did not work in this technique (data not shown). However, clear immunogold labeling was detected in the virions probed with the nsp2 and nsp3 pAbs (Fig. 5B). In addition, the gold particle distribution and the proportion of labeled virions with the nsp2 (285 labeled viruses out of 3,452 counted viruses [8.3%]) and nsp3 (291 labeled viruses out of 3,427 counted viruses [8.5%]) pAbs were very similar to those observed for the RdRp and N proteins (Table 1). Overall, these data indicated that nsp2 and most likely nsp8 were incorporated into the viral particles and that nsp3 was probably present in the viral envelope exposing the N-terminal region (recognized by the pAb) to outside the virion.

Although the presence of nsp2 and nsp3 in purified SARS-CoV has been previously reported using a proteomic approach (17), this is the first complete study indicating that RdRp, nsp2, and most likely nsp3 and nsp8 are incorporated into the CoV virions. Studies to investigate whether other viral and cellular components of the replication-transcription complex are also encapsidated and their role in the CoV life cycle are in progress. It could be postulated that the encapsidated RdRp together with other replicase proteins involved in CoV RNA synthesis could act as a starting replication machinery, allowing a first round of genome amplification before genome translation to improve the efficiency of virus infection.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank John Ziebuhr for providing us with nsp2 and nsp8 pAbs and S. Zúñiga and I. Sola for critically reading the manuscript.

This work was supported by grants from the Ministry of Science and Innovation of Spain (MCINN) (BIO2010-16705), the Spanish National Research Council (CSIC) (project 200920I024), the Community of Madrid (S-SAL-0185-2006), the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under the projects "PLAPROVA" (KBBE-227056) and "PoRRSCon" (EC grant agreement number 245141), and Pfizer Animal Health. S.M.-J. received a predoctoral fellowship from National Institute of Health (ISCIII) of Spain. A.N. and C.G. received a contract from the Spanish National Research Council (CSIC).

## REFERENCES

- Almazán F, Galán C, Enjuanes L. 2004. The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J. Virol.* 78:12683–12688.
- Bremer A, Häner M, Aebi U. 1998. Negative staining, p 277–284. In Celis JE (ed), *Cell biology, a laboratory handbook*, 2nd ed, vol 3. Academic Press, San Diego, CA.
- Brockway SM, Clay CT, Lu XT, Denison MR. 2003. Characterization of the expression, intracellular localization, and replication complex associ-

- ation of the putative mouse hepatitis virus RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.* 77:10515–10527.
- Carstens EB. 2010. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). *Arch. Virol.* 155:133–146.
- Correa I, Jiménez G, Suñé C, Bullido MJ, Enjuanes L. 1988. Antigenic structure of the E2 glycoprotein from transmissible gastroenteritis coronavirus. *Virus Res.* 10:77–94.
- de Groot RJ, et al. Coronaviridae, p 774–796. In Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberg U, King A (ed), *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, CA.
- Enjuanes L, Almazán F, Sola I, Zúñiga S. 2006. Biochemical aspects of coronavirus replication and virus-host interaction. *Annu. Rev. Microbiol.* 60:211–230.
- Enjuanes L, Sola I, Zúñiga S, Almazán F. 2008. Coronavirus replication and interaction with host, p 149–202. In Mettenleiter TC, Sobrino F (ed), *Animal viruses. Molecular biology*. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom.
- Galán C, et al. 2009. Host cell proteins interacting with the 3' end of TGEV coronavirus genome influence virus replication. *Virology* 391:304–314.
- Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM. 1989. Coronavirus genome: prediction of putative functional domains in the non-structural polyprotein by comparative amino acid sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 17:4847–4861.
- Gosert R, Kanjanahaluethai A, Egger D, Bienz K, Baker SC. 2002. RNA replication of mouse hepatitis virus takes place at double-membrane vesicles. *J. Virol.* 76:3697–3708.
- Jiménez G, Correa I, Melgosa MP, Bullido MJ, Enjuanes L. 1986. Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutralization. *J. Virol.* 60:131–139.
- Knoops K, et al. 2008. SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol.* 6:1957–1974.
- Kong Q, et al. 2010. Proteomic analysis of purified coronavirus infectious bronchitis virus particles. *Proteome Sci.* 8:29.
- Martín Alonso JM, et al. 1992. Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus nucleoprotein. *Virology* 188:168–174.
- Masters PS. 2006. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 66:193–292.
- Neuman BW, et al. 2008. Proteomics analysis unravels the functional repertoire of coronavirus nonstructural protein 3. *J. Virol.* 82:5279–5294.
- Nogales A, et al. 2011. Immunogenic characterization and epitope mapping of transmissible gastroenteritis virus RNA dependent RNA polymerase. *J. Virol. Methods* 175:7–13.
- Ortego J, Ceriani JE, Patiño C, Plana J, Enjuanes L. 2007. Absence of E protein arrests transmissible gastroenteritis coronavirus maturation in the secretory pathway. *Virology* 368:296–308.
- Risco C, Antón IM, Enjuanes L, Carrascosa JL. 1996. The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins. *J. Virol.* 70:4773–4777.
- Risco C, et al. 1995. Membrane protein molecules of transmissible gastroenteritis coronavirus also expose the carboxy-terminal region on the external surface of the virion. *J. Virol.* 69:5269–5277.
- Rodríguez MJ, et al. 2001. Identification of an immunodominant epitope in the C terminus of glycoprotein 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 82:995–999.
- Schelle B, Karl N, Ludwig B, Siddell SG, Thiel V. 2005. Selective replication of coronavirus genomes that express nucleocapsid protein. *J. Virol.* 79:6620–6630.
- Snijder EJ, et al. 2006. Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex. *J. Virol.* 80:5927–5940.
- Sola I, Mateos-Gomez PA, Almazán F, Zúñiga S, Enjuanes L. 2011. RNA-RNA and RNA-protein interactions in coronavirus replication and transcription. *RNA Biol.* 8:1–13.
- Ziebuhr J. 2005. The coronavirus replicase, p 57–94. In Enjuanes L (ed), *Coronavirus replication and reverse genetics*, vol 287. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Ziebuhr J, Snijder EJ, Gorbalenya AE. 2000. Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the *Nidovirales*. *J. Gen. Virol.* 81:853–879.
- Zúñiga S, et al. 2010. Coronavirus nucleocapsid protein facilitates template switching and is required for efficient transcription. *J. Virol.* 84:2169–2175.